

UNTERSUCHUNGEN ZU PLASTIZITÄT UND FUNKTION DES KSPV CORE-PROTEINS

CHRISTIANE M. RIEDEL



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Tillmann Rümenapf

Untersuchungen zu Plastizität und Funktion des KSPV Core-Proteins

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Christiane Maria Riedel
Tierärztin aus Pforzheim

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Tillmann Rümenapf
Prof. Dr. Christoph G. Greveling

Tag der Disputation: 28.01.2011

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Riedel, C., Lamp, B., Heimann, M., Rümenapf, T. (2010). Characterization of essential domains and plasticity of the CSFV Core-Protein. J. Virol. 2010 Aug 11. [Epub ahead of print].

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde über einen Zeitraum von 2 Jahren durch die Stiftung der Eheleute Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann gefördert.

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Tillmann Rümenapf und Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel
- der gesamten AG Rümenapf, Zwaantje Andreoli, Manuela Heimann, Angelika Irmner, Benjamin Lamp und Eveline Wentz
- meinen Eltern
- meinen Freunden
- Dr. Elisabeth Kamphuis
- Prof. Dr. Stephan Pleschka
- allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AEC	Aminoethylcarbazol
Ala	Alanin
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BDV	Border Disease Virus
BVDV	Bovine Virusdiarrhö Virus
C	Core-Protein
ca.	circa
cDNS	komplementäre DNS
cp	zytopathogen
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
°C	Grad Celsius
D	Doxycyclin
d	Tag
Δ	Deletion
DABCO	1,4-Diazabicyclo (2.2.2) octan
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindol
defic	defizient
DMEM	Dulbeccos minimales essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNS	doppelsträngige RNS
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
ffu	focus forming unit (Fokus-bildende Einheit)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanidin
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
IFN	Interferon
IRES	internal ribosomal entry site

IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon stimulated gene
IU	international Unit
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KSPV	Virus der klassischen Schweinepest
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MC	Methylcellulose
MD	mucosal disease
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
mRNS	messenger RNS
ncp	nicht zytopathogen
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTR	nicht translatierte Region
OAS	Oligoadenylatsynthetase
ORF	open reading frame
PAC	Puromycin N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PK	porcine kidney
PKR	Proteinkinase R
QC	quick change
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SK	swine kidney
SP	Signalpeptidase
SPP	Signalpeptidpeptidase
ss	single strand
STE	swine testicle
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	toll like receptor
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

wt
YFP

Wildtyp
yellow fluorescent protein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Pestiviren	1
1.1.1 Das pestivirale Core-Protein	2
1.1.2 Durch Pestiviren ausgelöste Erkrankungen	5
1.1.3 Der pestivirale Infektionszyklus	7
1.2 Das angeborene Immunsystem	7
1.3 Pestiviren und das angeborene Immunsystem	11
1.4 Pathophysiologie der KSP	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
 2. Material und Methoden	 15
2.1 Material	15
2.1.1 <i>Eukaryotische</i> Zelllinien	15
2.1.2 Primäre <i>eukaryotische</i> Zellen	15
2.1.3 <i>Prokaryotische</i> Zellen	15
2.1.4 Virusstämme und Plasmide	15
2.1.5 Antikörper	15
2.1.6 Enzyme	16
2.1.7 Chemikalien	16
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.9 Geräte	18
2.1.10 Kits	18
2.1.11 Inhibitoren	19
 2.2 Methoden	 19
2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten	19
2.2.1.1 Medien und Puffer	19
2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten	20
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl	20
2.2.1.4 Elektroporation von RNS in SK6-Zellen	21

2.2.1.5	Transfektion von linearisierter DNS in Zellen zur Generierung von Zelllinien	21
2.2.1.6	Selektion positiver Zellklone	22
2.2.1.7	Bestimmung des Virustiters	23
2.2.1.8	Bestimmung der Empfänglichkeit	23
2.2.1.9	Indirekter Immunperoxidase Assay	24
2.2.1.10	Isolierung von Endothelzellen aus porzinen Aorten	25
2.2.1.11	Isolierung von Monozyten aus Schweineblut	26
2.2.1.12	Virale Wachstumskurven	27
2.2.1.13	Bestimmung der RNS-Infektiosität	27
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.2.1	Anzucht von Bakterien	27
2.2.2.2	Plasmidisolierung	28
2.2.2.2.1	Minipräparation	28
2.2.2.2.2	Midipräparation	29
2.2.2.3.	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	30
2.2.2.4	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNS und RNS	31
2.2.2.5	Präzipitation von DNS / RNS mit Ethanol	31
2.2.2.6	Quantifizierung von DNS / RNS	32
2.2.2.7	Agarosegelelektrophorese von DNS / RNS	32
2.2.2.8	Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.2.9	Ligation von DNS-Fragmenten	33
2.2.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.2.11	Klonierung von PCR-Produkten	35
2.2.2.12	Ortsgerichtete Mutagenese	35
2.2.2.13	In-vitro Transkription	36
2.2.2.14	Sequenzierung von DNS mittels "Cycle Sequencing" mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern	37

2.2.2.15	Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen	38
2.2.2.16	Isolierung von Gesamt-RNS mittels RNeasy	39
2.2.2.17	Generierung und Amplifikation von cDNS	39
2.2.2.18	Klonierung von PCR-Fragmenten in pGEM-T	40
2.2.3	Klonierungen	41
2.2.3.1	Synthetische Oligonukleotide	41
2.2.3.2	Modifikation des Core-Proteins	42
2.2.3.3	Einfügen des 13B6 Epitops und Modifikation der N ^{pro} -Spaltstelle	44
2.2.3.4	Modifikationen im N ^{pro}	44
2.2.3.5	Klonierung von viralen Proteinen in pTRE	45
2.2.3.6	Klonierung von RT-PCR-Fragmenten der NS3-Region in den Gesamtklon	45
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.4.1	Zelllyse	46
2.2.4.2	SDS-PAGE	47
2.2.4.3	Immunoblotanalyse von Proteinen (Western Blot)	48
2.2.5	Fluoreszenzmikroskopie	49
3.	Ergebnisse	50
3.1	Charakterisierung von essentiellen Domänen und Plastizität des Vp447 Core-Proteins	50
3.1.1.	Modifikation des N-Terminus des Vp447 Core- Proteins	50
3.1.2	Modifikationen in zentralen Bereichen des Vp447 Core-Proteins	51
3.1.3	Modifikationen im C-terminalen Bereich des Vp447 Core-Proteins	54
3.1.4	Duplikation und Triplikation des Vp447 Core-Gens	55
3.1.5	Vp447 _{CC} mit ein bis drei YFP-Genen zwischen den beiden Core-Genen	57

3.2 Charakterisierung eines Vp447 mit kompletter Core-Deletion (AS 169-246)	63
3.2.1 Wachstum des Vp1017 auf primären Schweinezellen	63
3.2.2 Wachstum des Vp1017 auf verschiedenen Schweinezelllinien	67
3.2.3 Untersuchung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch das Vp1017	71
3.3 Untersuchung der Funktionalität von N ^{pro} in Core-Deletions-Mutanten des Vp447 durch Modifikation der N ^{pro} -Spaltstelle	73
3.3.1 Nachweis von N ^{pro} in der Western Blot Analyse und Fluoreszenzmikroskopie	73
3.3.2 Untersuchung der N ^{pro} -Funktion mittels Mutagenese der N ^{pro} -Core-Spaltstelle	76
3.3.2.1 Modifikation der Spaltstelle mit authentischen Aminosäuren	76
3.3.2.2 Modifikation der N ^{pro} -Core-Spaltstelle mit nicht-authentischen Aminosäuren	80
3.3.2.3 Modifikation der Protease-Aktivität des N ^{pro}	82
3.4. Charakterisierung des VpCR85	85
3.4.1 Wachstumseigenschaften des VpCR85 in verschiedenen porzinen Zelllinien	86
3.4.2 Empfänglichkeit von verschiedenen porzinen Zelllinien für das VpCR85 nach IFN α -Behandlung	89
3.4.3 Bestimmung der RNS-Infektiosität	92
3.4.4 Steigerung der Empfänglichkeit IFN α vorbehandelter, porziner Zelllinien für das VpCR85 durch Transkomplementierung von Core	94
4. Diskussion	97
4.1 Bestimmung von essentiellen Domänen im Core-Protein des Vp447	97
4.2 Untersuchungen zur Plastizität des Core-Proteins	100

4.3 Untersuchung von Core-Funktionen durch phänotypische Charakterisierung eines Vp447 mit deletiertem Core-Gen	104
5. Zusammenfassung	114
6. Summary	115
7. Literatur	116

1. Einleitung

1.1 Pestiviren

Pestiviren, sowie die Genera Flavivirus und Hepacivirus, bilden die Familie der *Flaviviridae*. Das Genus Pestivirus umfasst die Spezies Bovines Virus Diarrhoe Virus 1 und 2 (BVDV 1 und 2), Border Disease Virus (BDV) und Klassisches Schweinepest Virus (KSPV) sowie ein Isolat aus der Giraffe (giraffe-1) (Becher et al., 2003; Fauquet et al., 2005; Rümenapf und Thiel, 2008). Eine neue Spezies stellt das 2003 in Schweinen mit Fruchtbarkeitsproblemen nachgewiesene Bungowannah-Virus dar (Kirkland et al., 2007). Bisher nicht klassifiziert wurden die Isolate "Hobi" und "Antilope", sowie die "tunesischen Isolate" (Rümenapf und Thiel, 2008).

Mitglieder dieses Genus zeichnen sich durch ein einzelsträngiges RNS-Genom positiver Polarität aus, das für einen offenen Leserahmen kodiert. Die Größe des pestiviralen Genoms beträgt mindestens 12,3 kb. Durch Insertion zellulärer Sequenzen und Duplikationen sind jedoch BVDV-Genome mit einer Größe von bis zu 16,5 kb bekannt (Meyers und Thiel, 1996). Das 5'- und 3'-Ende des viralen Genoms wird von nicht translatierten Regionen (NTR) gebildet. Die Initiation der Translation erfolgt über eine "internal ribosomal entry site" (IRES) (Poole et al., 1995; Rijnbrandt et al., 1997; Kolupaeva et al., 2000) im Bereich der 5'-NTR des viralen Genoms. Die 3'-NTR der viralen RNS besteht aus 188-276 Nukleotiden und ist nicht polyadenyliert (Collett et al., 1988a; Becher et al., 1998).

Das virale Polyprotein umfasst etwa 4000 Aminosäuren (AS) und wird co- und posttranslational von viralen und zellulären Proteasen in die 12 viralen Proteine gespalten (Collett et al., 1988a; Collett et al., 1988b; Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993). Am N-Terminus des viralen Polyproteins befindet sich die Autoprotease N^{pro}. Sie ist einzig im Genus Pestivirus zu finden und generiert durch autoproteolytische Spaltung den N-Terminus des nachfolgenden Core-Proteins (Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993). Dieses zählt zusammen mit den sich anschließenden drei Glykoproteinen, E^{ns} ("ribonuclease secreted"), E1 und E2, zu den Strukturproteinen. Der C-Terminus des Core-Proteins wird, in Analogie zum Hepatitis C Virus (HCV) (McLauchlan et al., 2002), durch die Signal Peptid Peptidase (SPP) generiert (Heimann et al., 2006). E^{ns}, E1 und E2 sowie das darauf folgende

p7 werden durch die Spaltaktivität der Signal Peptidase (SP, oder auch Signalase) freigesetzt (Rümenapf et al., 1993; Lin et al., 1994; Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000). Als bisher einziges bekanntes virales Strukturprotein besitzt das E^{ms} eine RNase- Aktivität (Hulst et al., 1994; Schneider et al., 1993).

C-terminal auf das p7 folgen die viralen Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B als Bestandteile des viralen Replikationskomplexes. Ihre Prozessierung erfolgt durch die NS3-Protease und ihren Cofaktor NS4A (Wiskerchen et al., 1991; Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997), nachdem der N-Terminus des NS3 durch die autoproteolytische Abspaltung des NS2 generiert wird (Lackner et al., 2004). Die Effizienz der NS2-3 Spaltung wird durch das zelluläre Chaperon Jiv ("J-domain protein interacting with viral protein") reguliert (Lackner et al., 2005).

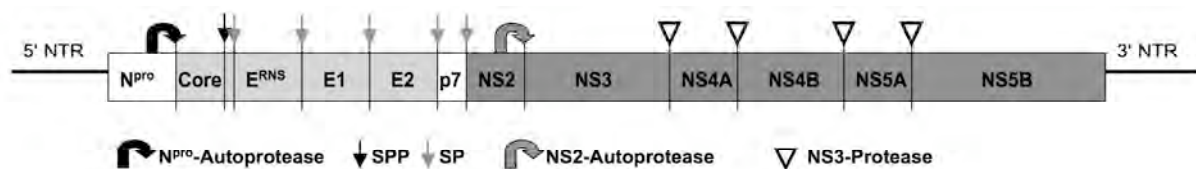


Abb. 1: Struktur des pestiviralen Genoms und Prozessierung des Polyproteins.

Strukturproteine sind in hellgrau dargestellt, Nichtstrukturproteine in dunkelgrau.

NTR = nicht translatierte Region; SPP = Signalpeptidase; SP = Signalpeptidase.

Die Virionen bestehen aus einer zellulären Lipidmembran, in der die viralen Glykoproteine verankert sind. Innerhalb dieser Lipidhülle befindet sich das virale Genom, das zusammen mit dem Core-Protein das Nukleokapsid des pestiviralen Partikels bildet (Horzinek et al., 1967; Rümenapf et al., 1991a). Pestiviren haben einen Durchmesser von 40-60 nm (Horzinek et al., 1971; Enzmann und Weiland, 1978; Lindenbach et al., 2007). Als behüllte Viren reagieren sie empfindlich auf Substanzen wie Äther, Chloroform und Detergentien, zeigen andererseits jedoch eine bemerkenswerte Toleranz gegenüber sauren pH-Werten (Depner et al., 1992; Krey et al., 2005).

1.1.1 Das pestivirale Core-Protein

Das pestivirale Core-Protein bildet zusammen mit der viralen RNS das Nukleokapsid des infektiösen Partikels. Es ist daher für die Virusmorphogenese essentiell, kann seine Funktion jedoch auch bei Bereitstellung durch ein in der Zelle zur Verfügung stehendes Expressionsplasmid (in trans), zusammen mit den restlichen

Strukturproteinen, erfüllen (Reimann et al., 2007). Der N-Terminus des Core-Proteins wird durch die virale Autoprotease N^{pro} generiert (Stark et al., 1993), der C-Terminus durch die Signalpeptidase (SPP) der Wirtszelle (Heimann et al., 2006). Nichtvirale Proteine können zwischen N^{pro} und Core exprimiert werden, so lange die Prozessierung des Core N-Terminus durch eine zusätzliche Spaltstelle gewährleistet ist (Fan und Bird, 2007).

Das Core-Protein des BVDV besteht aus 90 Aminosäuren (AS), das des KSPV aus 87 AS. Das berechnete Molekulargewicht des KSPV Core-Proteins liegt bei 9,7 kD (Strider), durch seine stark positive Ladung wird das Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE jedoch verändert. Daher ist das Core-spezifische Signal in der Western Blot Analyse bei etwa 16 kD detektierbar.

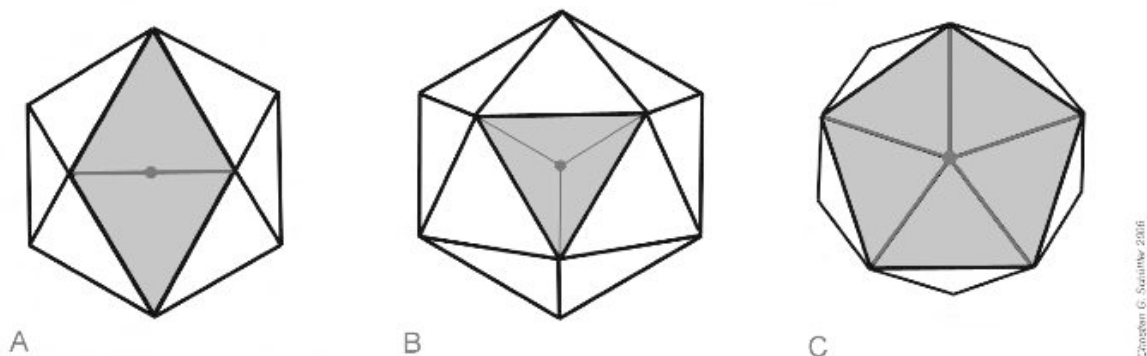
Untersuchungen des BVDV Core-Proteins ergaben, dass der Großteil des Proteins intrinsisch ungeordnet ist (Murray et al., 2008; Ivanyi-Nagy et al., 2008), d.h. unter nativen Bedingungen ist keine klar definierbare Konformation des Proteins bestimmbar (Hansen et al., 2006). Auch die Core-Proteine der Hepaci- und Flaviviren sind im N-terminalen Bereich intrinsisch ungeordnet, was die Bindung von Nukleinsäuren ermöglichen soll (Fan et al., 1999). Insgesamt besitzen die Core-Proteine der Flaviviren und des HCV eine dimere, alpha-helikale Struktur (Jones, 2003; Boulant et al., 2005). Das pestivirale Core-Protein hingegen weist nur am C-Terminus einen strukturierten, 15 AS umfassenden Bereich alpha-helikaler Konformation auf. Die C-terminale, hydrophobe Domäne des HCV Core-Proteins ist für dessen Assoziation mit "lipid droplets" sowie die korrekte Lokalisierung des Polyproteins an der ER-Membran verantwortlich (Boulant et al., 2006), wo die Prozessierung durch die SPP erfolgt. Die AS 247-267 des KSPV Polypeptids dienen als Signalpeptid für die Translokation der nachfolgenden Proteine in das ER-Lumen. Somit ist dieses Signalpeptid auch Teil des Core-Protein C-Terminus.

Das BVDV Core-Protein besitzt RNS-Chaperon-Aktivität (Ivanyi-Nagy et al., 2008), bindet RNS mit niedriger Spezifität und Affinität und ist in der Lage, eine nicht verwandte, unspezifische virale RNS-Bindungs- und Kondensationsdomäne zu substituieren (Murray et al., 2008). Welche Funktion diese Chaperon-Aktivität im Lebenszyklus des Virus einnimmt ist bisher unbekannt.

Für alle Mitglieder der *Flaviviridae* wurde angenommen, dass sie ein ikosaedrales Kapsid, bestehend aus Core-Protein und viralem Genom, besitzen. Ein Ikosaeder besteht aus gleichseitigen Dreiecken, die aus jeweils drei äquivalenten,

asymmetrischen Untereinheiten (asU) zusammengesetzt sind. Jede dieser asymmetrischen Untereinheiten kann wiederum aus mehreren Kopien eines Proteins gebildet werden. Ein Ikosaeder besitzt 3 Symmetrieachsen, wobei es sich um eine zwei-, drei- und fünffache Symmetrie handelt. Schon 1956 wurde diese Form von Watson und Crick als effektivste Form, ein möglichst großes Volumen durch viele Kopien eines kleinen Moleküls zu umfassen, angesehen. Strukturanalysen des Dengue Virus (DV) ergaben jedoch, dass der innere Teil des Virions, der das Core-Protein und die genomische RNS enthält, unstrukturierter erscheint als die äussere Hülle (Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2003), für die eine klare ikosaedrale Struktur der Glykoproteine ermittelt werden konnte. Gleiches wird auch für das Kapsid des HCV Partikels postuliert (Yu et al., 2007). Somit ist die Struktur des Nukleokapsids der Flavi- und Hepaciviren nicht ikosaedrisch. Neuere Untersuchungen zur Struktur des Nukleokapsids von Pestiviren fehlen jedoch.

Symmetrieachsen bei ikosaedrischen Viruskapsiden



(Quelle: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:symmetrieachsen_Kapsid.jpg&filetimestamp=20060721062058;
Gleiberg, 2006: Symmetrieachsen/Rotationssymmetrie eines ikosaedrischen Viruskapsids)

Abb. 2: Symmetrieachsen eines ikosaedralen Kapsids (A: 2; B: 3; C: 5; dunkelgraue Linien), die sich alle im Zentrum des Ikosaheders schneiden (grauer Punkt).

In der AG von Prof. Rümenapf gelang es, ein KSPV (Vp1017) zu etablieren, das eine nahezu komplette Deletion (bis auf die letzten neun C-terminalen AS) des muren Core-Proteins aufweist und trotzdem in Zellkultur überlebensfähig ist. Die Generierung dieses Virus gelang durch Passagierung eines KSPV (Vp835) auf der porzinen Nierenzelllinie SK6, das durch die Verhinderung der SPP Spaltung kein reifes Core-Protein (C255) bilden konnte und daher in seiner Partikelbildung zunächst stark eingeschränkt war. Nach etwa 48h zeigte das Vp835 jedoch einen starken Anstieg der Virusproduktion, hervorgerufen durch einen kompensatorischen Aminosäureaustausch in der Helikasedomäne des NS3-Proteins (N2177Y). Durch

Einführung dieser Mutation in das Genom des Vp1017 war es möglich ein Virus zu erhalten, welches in Abwesenheit des Core-Proteins infektiöse Partikel bilden kann. Untersuchungen in vivo zeigten, dass die Infektion mit dem Vp1017 eine protektive Immunität gegen ein homologes KSPV (Stamm Alfort Tübingen, Vp447) im Schwein induziert. Eine Virusisolierung aus dem natürlichen Wirt war für das Vp1017 nicht möglich, und die Tiere zeigten keine Anzeichen von Erkrankung.

1.1.2 Durch Pestiviren ausgelöste Erkrankungen

Pestiviren infizieren nur Paarhufer und sind daher fast ausschließlich auf Zelllinien von Mitgliedern dieser Ordnung anzüchtbar. Als wirtschaftlich wichtige Erkrankungen sind die Bovine Virus Diarrhoe (BVD) und die Klassische Schweinepest (KSP) in Deutschland anzeigepflichtig. Die KSP wird von der Office Internationale des Epizooties (O.I.E.) in Liste A geführt, da es sich um eine gefährliche Seuche mit starken Auswirkungen auf Tier und Ökonomie handelt.

Bei der BVD handelt es sich um eine meist subklinisch oder mild verlaufende Erkrankung, die durch Fieber, Diarrhö und reduziertes Allgemeinbefinden gekennzeichnet ist. Durch die Auslösung einer Lymphopenie hat die Infektion mit dem BVDV auch immunsuppressive Effekte und spielt daher auch eine Rolle als Wegbereiter für Atemwegserkrankungen (Potgieter et al., 1985; Baker 1987; Thiel et al., 1996). In den USA wurden durch BVDV2-Stämme ausgelöste, schwere Thrombozytopenien als hämorrhagisches Syndrom beschrieben (Pellerin et al., 1994; Ridpath und Bolin, 1995). Epidemiologisch und pathogenetisch am bedeutsamsten ist jedoch die kongenitale Infektion mit dem BVDV. Bei Infektion des Fetus im ersten Drittel der Trächtigkeit kommt es zu Aborten oder zur Etablierung einer persistierenden Infektion. Persistent infizierte Tiere (PI) entwickeln keine spezifische Immunantwort gegen das BVDV, sind virämisch und scheiden große Mengen an Virus aus. Durch Rekombinationen des viralen Genoms mit viralen oder zellulären Sequenzen kann es im virämischen Tier zusätzlich zur Entstehung eines zytopathogenen Biotyps des Virus kommen, was den Ausbruch der immer letal verlaufenden "mucosal disease" bedeutet (Liess et al., 1974; McClurkine et al., 1985; Corapi et al., 1988; Meyers et al., 1996; Meyers und Thiel, 1996). Hierbei kommt es

zu massiver Zytolyse, was sich in Schleimhautblutungen und unstillbaren, blutigen Durchfällen äussert.

Das Border Disease Virus (BDV) ist ein Pathogen der Schafe. Die Infektion führt meist zu reduzierter Reproduktionsleistung (Shaw et al., 1967; Vantsis et al., 1979) und missgebildeten Lämmern ("hairy shaker disease") (Meyers und Thiel, 1996; Thiel et al., 1996). Auch enterale Manifestationen der Infektion wurden beschrieben (Nettleton et al., 1995).

Infektionen mit dem KSPV zeigen je nach Alter und Immunstatus des infizierten Tieres sowie der Virulenz des beteiligten KSPV-Isolats ein sehr variables klinisches Bild (Thiel et al., 1996). Die akute Form tritt vor allem bei bis zu zwölf Wochen alten Tieren auf. Sie ist zunächst gekennzeichnet durch unspezifische Symptome wie Fieber, Depression sowie respiratorische und enterale Beschwerden. Im Verlauf der Erkrankung zeigen betroffene Tiere Hämorrhagien und häufig neurologische Ausfallserscheinungen. Die starke Immunsuppression durch eine massive Lymphopenie macht die Tiere anfällig für Sekundärinfektionen (Depner et al., 1994; Laevens et al., 1999). Mit zunehmendem Alter der betroffenen Schweine werden die Symptome milder und die Erkrankung kann überwunden werden. Die chronische Form der KSP ist immer tödlich. Betroffene Tiere äussern zuerst Symptome ähnlich der akuten Form, sind aber nicht in der Lage, das Virus durch eine adäquate Immunantwort zu eliminieren. Bis zum Tod können 2-3 Monate vergehen, in denen die Tiere intermittierend Fieber und Enteritis zeigen (Depner et al., 1997).

Die pränatale Form der KSP tritt bei diaplazentarer Übertragung des Virus auf, wobei die Infektion der Sau meist subklinisch verläuft. Die Infektion der Feten führt zu Missbildungen, Aborten und Mumienbildung. Es kann jedoch, ähnlich wie bei der BVD, zur Generierung von immuntoleranten, persistent infizierten Ferkeln kommen. Sie können mehrer Monate alt werden, kümmern jedoch und scheiden konstant Virus aus, wodurch sie epidemiologisch von großer Bedeutung sind (Van Oirschot & Terpstra, 1977; Moennig et al., 2003). Dies wird auch als "late onset" Form der KSP bezeichnet.

1.1.3 Der pestivirale Infektionszyklus

Infektionsprozesse der Pestiviren wurden bisher am ausführlichsten für das BVDV beschrieben. CD46, ein Zelloberflächenmolekül, das dem Schutz der Zelle vor Komponenten des Komplementsystems dient, wurde als BVDV Rezeptor indentifiziert (Maurer et al., 2004). Hingegen fungiert der LDL-Rezeptor nicht als Rezeptor für das BVDV (Krey et al., 2006). Für die Infektion ist das Vorhandensein von E1-E2-Heterodimeren im Partikel essentiell, die durch Interaktion der Transmembrandomänen dieser beiden Proteine gebildet werden (Ronecker et al., 2008). Nach Bindung an den Rezeptor wird das BVDV über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen und die virale Hülle fusioniert nach Absenkung des pH-Werts im Endosom mit dessen Membran, um das Nukleokapsid in das Zytoplasma zu entlassen (Krey et al., 2005). Hier erfolgen dann ER-nah Translation und RNS-Replikation. Es wird vermutet, dass die Viruspartikel durch budding an der ER-Membran gebildet werden. Im Gegensatz zum Genus Flavivirus sind intrazelluläre hepaci- und pestivirale Partikel infektiös (Gastaminza et al., 2006; Macovei et al., 2006).

Das bei Pestiviren zu beobachtende Phänomen der "superinfection exclusion", also die Verhinderung der Infektion einer schon mit demselben Virus infizierten Zelle, wird durch eine Inhibition der Infektion durch intrazelluläre Expression von E2 hervorgerufen. Erstaunlicherweise setzt dieser inhibitorische Effekt erst nach Rezeptorkontakt und Bindung des Virus an die Zelle ein. Zusätzlich wurde noch eine Hemmung der Replikation des superinfizierenden Virus beschrieben (Lee et al., 2005; Tscherne et al., 2008).

1.2 Das angeborene Immunsystem

Im Gegensatz zum zellulären Immunsystem stellt das angeborene Immunsystem ein phylogenetisch altes System dar, dass nicht auf spezifische Eigenschaften einzelner Pathogene (spezifische Antigene), sondern auf molekulare Strukturen, die charakteristisch für Gruppen von Pathogenen sind, reagiert. Hierzu gehören beispielsweise das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) oder dsRNS-Strukturen. Es

besteht aus zellulären und löslichen Komponenten. Zu den zellulären Komponenten zählen natürliche Killerzellen, sowie Makrophagen und dendritische Zellen, die jedoch schon eine Brücke zur Aktivierung des spezifischen Immunsystems schlagen. Lösliche Komponenten beinhalten zum einen direkte Effektoren, wie das Komplementsystem, zum anderen Botenstoffe, die para-, auto- und endokrin wirken. Hierzu zählt die Gruppe der Interferone (IFN), als wichtige antivirale Faktoren (Katze et al., 2002), sowie die Gruppe der Zyto- und Chemokine (TNF, Interleukine u.a.). Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die schnelle Erkennung von Pathogenen sowie die Generierung einer ersten Abwehrantwort durch die Aktivierung von Effektorprozessen (Janeway et al., 2002). Jede Körperzelle ist mit Sensoren für Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMS) ausgestattet. Diese befinden sich auf der Zelloberfläche, in Endosomen und im Zytoplasma. Bei Kontakt mit PAMS setzen sie Signalkaskaden in Gang, die in der Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren enden. Durch diese Faktoren exprimierte Gene kodieren für Botenstoffe (positives Feedback), antimikrobielle Faktoren sowie Regulatoren des Zellstoffwechsels. Diese Aktivierung der Zellen kann auch zum programmierten Zelltod, der Apoptose, führen.

Interferone bilden eine Familie strukturell verwandter Zytokine, die nur bei Vertebraten zu finden sind. Neben ihrer antiviralen Aktivität besitzen sie antitumoröse Wirkung und immunmodulatorische Eigenschaften (Takaoka und Yanai, 2006). Zu den Interferonen der Gruppe I gehören je ein Gen für IFN β , ω , ϵ (Langer et al., 2004; Pestka et al., 2004) und κ (LaFleur et al., 2001) sowie mehrere Gene für IFN α . Zusätzlich werden spezieabhängig noch IFN δ (Lefevre et al., 1998), τ (Roberts et al., 1999) und ζ (Oritani et al., 2001) differenziert. Alle Interferone der Gruppe I verwenden den gleichen, aus zwei Untereinheiten bestehenden Rezeptor. Interferone der Gruppe II werden durch IFN γ repräsentiert, das ausschließlich durch Zellen des Immunsystems gebildet wird und eine zentrale Rolle in der Differenzierung von T-Zellen zu CD4⁺T-Helferzellen des Typ 1 und CD8⁺T-Zellen spielt (Ikeda et al., 2002). In der Gruppe III der Interferone finden sich Moleküle anderer Struktur, die über die Interaktion mit einer spezifischen Rezeptoruntereinheit den Interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF-3) rekrutieren können, der auch von den Interferonen der Gruppe I als Transkriptionsfaktor verwendet wird (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003; Vilcek et al., 2003).

Für die Detektion viraler Infektionen existieren verschiedene Klassen von Rezeptoren. Die "retinoic acid inducible gene I" Rezeptoren wie "retinoic acid inducible gene I" (RIG-I) und "melanoma differentiation-associated gene 5" (mda-5) erkennen dsRNS- sowie ssRNS-5'Triphosphat-Strukturen (Hornung et al., 2006; Pichlmaier et al., 2006; Yoneyama et al., 2004; Kang et al., 2002) im Zytoplasma. Bei Kontakt mit ihrem Substrat interagieren sie mit dem "IFN- β promotor stimuator 1" (IPS-1). Dieser ist in der Lage, zwei Signalkaskaden zu rekrutieren, die in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Interferon-regulierter Faktor (IRF) -3, -7, sowie "nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells" (NF κ B) münden. IRF-3 und -7 bewirken die Expression von Typ I Interferon (Sato et al., 2000; Honda et al., 2005a) sowie bestimmter Interferon-induzierbarer Gene (Honda et al., 2006; Honda et al., 2005; Doyle et al., 2002). NF κ B ist für die Expression proinflammatorischer Cytokine verantwortlich.

Die "toll like receptors" (TLR) sind membranassoziierte Rezeptoren, die bakterielle und virale Komponenten im Bereich der Plasmamembran und zytoplasmatischen Vesikel detektieren können (Akira et al., 2001; Medzhikov et al., 2000). Wichtig für virale Infektionen sind TLR-3 (dsRNS) (Alexopoulou et al., 2001), TLR-7/8 (ssRNS) (Heil et al., 2004; Lund et al., 2004) und TLR-9 (unmethylierte DNS mit CpG-Motiven), die alle in zytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert sind. Ihre Aktivierung führt wiederum über verschiedene Signalkaskaden zur Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, -7 und NF κ B.

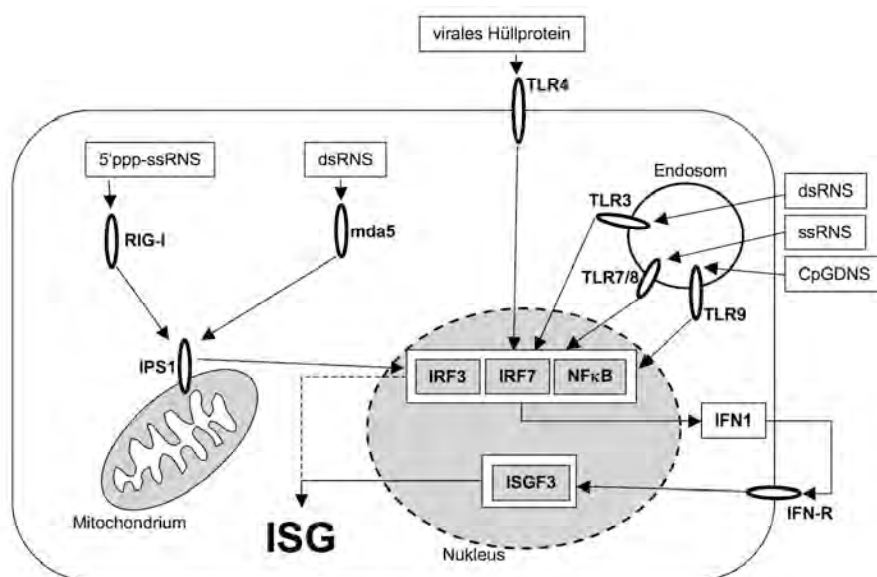


Abb. 3: Induktion des IFN-Systems durch virale PAMS und Amplifizierung des Signals durch Expression von IFN Typ I. ISG = IFN-stimulierte Gene; IFN-R = IFN-Rezeptor; gestrichelter Pfeil = partielle Expressionsinduktion.

Die Expression der Typ I Interferone führt zu einer Aktivierung benachbarter Zellen und einer Verstärkung der Reaktion der Zelle selbst durch Amplifikation der IFN-Stimulation. Das Interferon reagiert an der Zelloberfläche mit seinem Rezeptor, der über die Aktivierung der Jak-STAT-Kaskade zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors "IFN-stimulated gene factor 3" (ISGF-3) führt, der aus IRF-9, STAT 1 und STAT 2 besteht. Dieser induziert auch die Expression von IRF-7, wodurch es zu einer starken Amplifikation der Signaltransduktion des IFN-Systems kommt (Marie et al., 1998; Sato et al., 1998; 2000).

Typ I Interferone regulieren bis zu 300 verschiedene Gene (Der et al., 1998; Sen et al., 2007). Je nach Promotor werden neben IRF-3 bzw. -7 als zentralen Transkriptionsfaktoren noch weitere Cofaktoren benötigt, wie das für die Expression des IFN- β benötigte "Enhanceosome", bestehend aus IRF-3 bzw. -7, CREB-binding protein (CBP), p65, p50 sowie ATF2-JUN, zeigt (Wathelet et al., 1998).

Von der Vielzahl der IFN-induzierten Gene sind bisher nur wenige detailliert beschrieben worden. Wichtige Effektoren stellen die Proteinkinase R (PKR) sowie das 2'5'Oligoadenylatsynthetase (OAS) /RNaseL-System dar. Bei der PKR handelt es sich um eine durch dsRNS-Strukturen aktivierbare Proteinkinase, die zur Phosphorylierung des elongation initiation factor 2 α (eIF2 α) führt (Roberts et al., 1976; Levin et al., 1978; Nanduri et al., 2000; Dar et al., 2005). Eine Aktivierung der PKR ist auch durch Ceramide (Ruvolo et al., 2001) sowie spezifische Proteine möglich (Patel et al., 1998). Der eIF2 ist verantwortlich für die Translokation von RNS mit Cap-Struktur an die 40S Untereinheit des Ribosoms. Bei diesem Vorgang wird GTP zu GDP umgesetzt und eIF2 muss durch den Austausch von GDP zu GTP regeneriert werden. Dieser Vorgang wird durch die β -Untereinheit des eIF2 vermittelt. Ist der eIF2 α jedoch phosphoryliert, ist seine Affinität zu eIF2 β so hoch, dass der Austausch von GDP zu GTP nicht mehr möglich ist (Ramaiah et al., 1994). Dies führt zu einer Blockade der Translation von RNS mit Cap-Struktur. Zusätzlich wird der PKR eine Rolle in der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie bei der Auslösung von Apoptose zugeschrieben (Kumar et al., 1994; Der et al., 1997; Wong et al., 1997; Hsu et al., 2004).

Das 2'5'OAS/RNaseL-System besteht aus einem Sensorenzym der 2'5'OAS-Gen-Familie (Hovanessian und Justesen, 2007), und einem Effektorenzym, der RNaseL.

Bei Kontakt mit dsRNS-Strukturen kommt es zu einer Aktivierung der 2'5'OAS, was die Bildung von 2'5'Oligoadenylaten zur Folge hat, die wiederum als Aktivatoren der RNaseL dienen (Kerr et al., 1977; Clemens et al., 1978; Rebouillat et al., 1999). Die RNaseL dimerisiert bei Aktivierung (Nakanishi et al., 2005) und schneidet daraufhin unspezifisch ssRNS (Floyd-Smith et al., 1981; Wreschner et al., 1981). Auch ein Abbau der 28S ribosomalen RNS wurde beschrieben (Iordanov et al., 2000). Hierdurch wird eine effiziente Blockade der Translation erreicht. Auch eine Rolle bei der Apoptoseinduktion wird den 2'5'OASen zugeschrieben (Castelli et al., 1998).

Ein weitere, streng IFN-induzierte Effektorfamilie stellt die Gruppe der Mx-Proteine dar (Haller et al., 1980). Bei ihnen handelt es sich um große GTPasen, deren Funktion vermutlich in der Erkennung und Immobilisation von Nucleokapsid-artigen Strukturen liegt (Kochs et al., 1998; Kochs und Haller, 1999; Weber et al., 2000). Zusätzlich sind sie in der Lage, mit viralen Polymerasen zu interagieren und dadurch die Transkription des viralen Genoms zu blockieren (Turan et al., 2004).

1.3 Pestiviren und das angeborene Immunsystem

Auf Grund ihrer speziellen epidemiologischen Eigenschaften (Generierung von persistent infizierten Tieren) ist es für Pestiviren von zentraler Bedeutung, eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu verhindern oder zumindest hinauszuzögern. Im Zusammenhang mit dem angeborenen Immunsystem wurde besonders das N^{pro} der Pestiviren als Inhibitor von dsRNS-induzierter Apoptose und Aktivierung des IFN-Systems beschrieben (Ruggli et al., 2003, 2005; Bauhofer et al., 2005). N^{pro} ist in der Lage, unabhängig von einer funktionellen Proteasedomäne (Gil et al., 2006; Hilton et al., 2006; Chen et al., 2007; Ruggli et al., 2008), den Transkriptionsfaktor IRF-3 zu inhibieren. Dies wird der Induktion des proteasomalen Abbaus des IRF-3 (Bauhofer et al., 2007; Chen et al., 2007; Hilton et al., 2006) zugeschrieben, der durch die Nutzung einer Phosphorylierungsstelle am N^{pro} als Ubiquitylierungsstart ausgelöst wird (Chen et al., 2007). Andere Autoren beschreiben den Verlust der IRF-3-Funktion durch die Inhibition der Transkription des IRF-3 Gens (LaRocca et al., 2005) oder durch die Verhinderung der Interaktion von IRF-3 mit der chromosomalen DNS (Baigent et al., 2002). N^{pro}-Deletionsmutanten (Δ N^{pro}KSPV) sind in Zellkultur vermehrungsfähig (Lai et al., 2000; Tratschin et al., 1998) und ihre

Wachstumseigenschaften sind mit dem KSPV Wildtyp vergleichbar, wenn die Sequenzen der IRES intakt bleiben. Jedoch zeigt sich generell eine Verzögerung des Wachstums um etwa 6h (Mayer et al., 2004). In vivo sind ΔN^{pro} KSPV apathogen, induzieren jedoch eine protektive Antikörperantwort (Mayer et al., 2004). Dies kann jedoch nicht allein auf den IRF-3-Antagonismus des N^{pro} zurückgeführt werden (Ruggli et al., 2009). Durch Ausschaltung dieser Eigenschaft kommt es zwar zu einer Verminderung der Virulenz schwach- und mittelvirulenter Stämme, hochvirulente Stämme erfahren jedoch eine Steigerung derselben. Untersuchungen mit einem zytopathogenen KSPV (cpKSPV) zeigten, dass N^{pro} nicht in der Lage ist, die dsRNS vermittelte IFN-Induktion bzw. die Reifung dendritischer Zellen bei überschüssender Replikation des Virus zu verhindern (Bauhofer et al., 2005). Hieraus kann gefolgert werden, dass Pestiviren sowohl eine regulierte dsRNS-Produktion - die in einem cpKSPV durch eine überschüssende Replikation nicht gegeben ist - und ein intaktes N^{pro} benötigen, um eine Aktivierung der Wirtszellen zu verhindern.

Auch das pestivirale Glykoprotein E^{ns} wurde im Hinblick auf das angeborene Immunsystem untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass E^{ns} in der Lage ist, die Aktivierung des IFN-Systems durch extrazelluläre ds- und ssRNS zu verhindern (Iqbal et al., 2004; Magkouras et al., 2008; Mätzener et al., 2009). Dies wird der RNase-Aktivität des E^{ns} zugeschrieben.

Für das BVDV wurde gezeigt, dass eine Stimulation der Zellen durch Interferon nach Etablierung der Infektion nur zu einer geringen Verminderung des viralen Wachstums führt. Das Virus zeigt dabei keine Inhibition des IFN-Rezeptorpfades. Gleichzeitig ist es durch diese Behandlung nicht möglich, das Virus aus den Zellen zu verdrängen. Andere Viren werden jedoch in denselben Zellen effektiv durch das IFN-System inhibiert (Schweizer et al., 2006).

Trifft das KSPV oder das BVDV jedoch auf Zellen, die eine Aktivierung des IFN-Systems erfahren haben, so kommt es zu einer starken Inhibition des Wachstums (Knoetig et al., 2002; Schweizer et al., 2006). Diese ist im KSPV-System durch die Verwendung eines PKR-Inhibitors (2-Aminopurin) revertierbar (Knoetig et al., 2002).

1.4 Pathophysiologie der KSP

Die Aufnahme des KSPV erfolgt meist oronasal (Dunne et al., 1959; van Oirschot und Terpstra, 1989) und führt zu einer Infektion der Epithelzellen sowie der Kryptenzellen im Bereich der Tonsillen des betroffenen Tieres (Ressang et al., 1973; Liess, 1987; van Oirschot und Terpstra, 1989). Durch die Replikation des Virus kommt es zu einer Aktivierung von konventionellen dendritischen Zellen sowie Makrophagen, die mit einer massiven Bildung der Zytokine TNF- α und IL-10 reagieren. Innerhalb von 48h nach der Infektion kann virales Antigen in den germinalen Zentren der Tonsillen gefunden werden, nach 72h schon die ersten Antigen-aktivierten B-Lymphozyten (Jamin et al., 2008). Virus im Blut ist 16-24h nach der Infektion nachweisbar (Ressang et al., 1973). Monozyten und Makrophagen können als die primären Zielzellen des KSPV angesehen werden. Veränderungen an Endothel, Knochenmark, Darm und die starke Apoptose von Lymphozyten werden auf die massive Freisetzung von Zytokinen durch Makrophagen zurückgeführt (Summerfield, 2000; Nunez, 2005; Gomez-Villamandos et al., 2003, 2001; Sanchez-Cordon et al., 2005, 2003, 2002). Hierbei spielen vor allem TNF- α und platelet activating factor (PAF), als Auslöser von Mikrothromben und Thrombozytopenie (Bautista et al., 2002), eine wichtige Rolle. Während der virämischen Phase kommt es zur Infektion eines speziellen Typs der dendritischen Zelle, der plasmazytoiden dendritischen Zelle. Diese Zellen verwenden anstelle von IRF-3 IRF-7 als Haupttranskriptionsfaktor nach Aktivierung von Rezeptoren durch Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMS) (Summerfield und McCullough, 2009), und die Aktivierung des IFN-Systems ist daher durch das pestivirale N^{pro} nicht inhibierbar. Somit kommt es zu einer massiven Ausschüttung von IFN α , die schon 2 Tage nach Infektion nachweisbar ist und mit dem Auftreten der Lymphopenie korreliert (Summerfield et al., 2006).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Durch das Einfügen von Deletionen und Verkürzungen in das Core-Protein des KSPV Alfort Tübingen (Vp447) sollen Domänen identifiziert werden, die essentiell für die Bildung von Viruspartikeln sind. Die Amplifikation des Core-Gens im Gesamtklonkontext sowie die Insertion von Fremdgenen zwischen Core-kodierende Regionen sollen dazu beitragen, mehr über die Toleranz des Viruskapsids gegenüber Größenveränderungen seiner Bestandteile, und ggf. auch über seine potentielle Symmetrie, zu erfahren.

Die Tatsache, dass das Core-Protein für ein Wachstum in Zellkultur bei Vorhandensein einer kompensierenden Mutation in der NS3-Region nicht mehr benötigt wird, jedoch für ein Wachstum in vivo essentiell zu sein scheint, wirft die Frage nach von der Partikelbildung unabhängigen Funktionen des Core-Proteins auf. Diese Fragestellung soll durch die Charakterisierung eines Vp447 mit nahezu vollständiger Deletion des Core-Proteins (AS170-246; Vp1017) auf primären Schweinezellen und verschiedenen Schweinezelllinien untersucht werden, wobei ein besonderes Augenmerk auf das Verhalten des Virus bei Aktivierung des IFN-Systems gerichtet ist.

Die Ziele dieser Arbeit sind somit:

- Bestimmung von essentiellen Domänen im KSPV Core-Protein
- Untersuchung der Plastizität des KSPV Core-Proteins
- Charakterisierung der Core Funktion - unter Berücksichtigung des angeborenen Immunsystems - durch Verwendung des Vp1017

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Eukaryotische Zelllinien*

SK6 (swine kidney)	Institut für Virologie, Gießen
SK6 tet on (enthalten Tet-On Plasmid)	Institut für Virologie, Gießen
PK15 (porcine kidney)	ATCC Nr.: CCL-33
PK15 tet on (enthalten Tet-On Plasmid)	Institut für Virologie, Gießen
STE (swine testicle)	Institut für Virologie, Gießen

2.1.2 Primäre *eukaryotische Zellen*

porzine Monozyten / Makrophagen
porzine Endothelzellen der Aorta

2.1.3 *Prokaryotische Zellen*

E.coli K12-Stamm HB101

2.1.4 Virusstämme und Plasmide

KSPV Stamm Alfort Tübingen (Vp447 als Plasmid p447)
BVDV Stamm NCP-7 (VpNCP-7 als Plasmid pNCP-7)

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper:

Maus mAk A18:	gerichtet gegen das E2-Glykoprotein des Vp447
Maus mAk 5H4	gerichtet gegen das Core-Protein des Vp447
Maus mAk 13B6	gerichtet gegen das N ^{pro} -Protein des BVDV
Maus mAk	gerichtet gegen β -Aktin (Sigma-Aldrich)
Maus mAk M143	gerichtet gegen humanes MxA (Universität Freiburg)
Maus mAk M2	gerichtet gegen Flag-Epitop (Sigma-Aldrich)
Kaninchen mAK	gerichtet gegen PDI

Sekundärantikörper:

Ziege anti-Maus IgG, Meerettich Peroxidase konjugiert (Dianova)

Ziege anti-Maus IgG, Cy3 konjugiert (Dianova)

Ziege anti-Maus IgG, Alexa 488 konjugiert (Dianova)

Ziege anti-Kaninchen IgG, Cy3 konjugiert (Dianova)

2.1.6 Enzyme

DpnI (New England Biolabs)

Pfu DNA-Polymerase (Promega)

Taq DNA-Polymerase (Biotherm)

Superscript reverse Transkriptase 2 (Invitrogen)

SP6 RNA-Polymerase (New England Biolabs)

T4-DNA Ligase (New England Biolabs)

T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs)

Trypsin (Sigma)

Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs)

2.1.7 Chemikalien

Produkt	Hersteller
1kb-DNS-Leiter	Invitrogen
Aceton	Roth
Acrylamid (reinst, 2x krist.)	Serva
Agar-Agar	DIFCO
Agarose	GIBCO (Invitrogen Co.)
Ammoniumperoxisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Fluka
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Merck
Chaps	Applichem
Chloroform	Fluka
Desoxyribonukleotide	Roche
1,4-Diazabicyclo(2.2.2)oktan (DABCO)	Fluka
DMEM-Pulver	Invitrogen
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas
Doxyzyklin	ICN
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA)	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Fluka
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim

Formaldehyd	Merck
G418 Sulfat	Calbiochem
Harnstoff	Roth
Interferon- α (human)	Roche
Isopropanol	Fluka
Magermilchpulver	Frema
Methanol	Fluka
Methylcellulose	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumhydroxid	Fluka
Paraformaldehyd	Fluka
Penicillin	Sigma-Aldrich
Phenol	Appligene
Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol)	Sigma-Aldrich
Ponceau Rot	Roth
Puromycin-Dihydrochlorid	Appligene
Ribonukleotide	New England Biolabs
Rubidiumchlorid	Fluka
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	ICN
Streptomycin	Sigma-Aldrich
TEMED	Fluka
Tris	Roth
Trypanblau	Cambrex
TWEEN 20	Fluka
Wasser, RNase frei	Roth
Wasserstoffperoxid	Roth

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Braun
Filterpapier	Whatman
Gewebekulturgefäße	Falcon
Glasdeckglässchen (12mm)	MAGV
Nitrozellulosemembran	Pall
Nukleobond AX 100 Säulen	Machery-Nagel
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilm Biomax MR	Kodak
Biomax light	
Objektträger	Roth

2.1.9 Geräte

Bakterienschüttler	Infors
BioRad Gene Pulser II	BioRad
Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Forma Scientific; Memmert
Glaswaren	Schott / Seromed
Gefrierschränke	Liebherr
Geldokumentationssystem (DNS)	MWG Biotech
Heizblöcke	Eppendorf
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge Laborfuge 400R	Heraeus
Magnetrührer	IKA
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon
Konfokales Lasermikroskop TCS SP5	Leica
PCR-Maschine	Eppendorf; Perkin Elmer
Pipetten	Eppendorf; Gilson; Biohit
Reinstwasseranlage	Purolab
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	AGFA
Spannungsgeräte	Biorad; Stratagene
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Sequenziergerät LICOR 4000L	Licor
Schüttler	Edmund Bühler
Vortex	IKA
Waagen	Mettler
Wasserbad	Braun

2.1.10 Kits

DNA Gel Extratction kit	Millipore, Quiagen
PCR Purification kit	Quiagen
pGEM-T Vektor System I	Promega
RNeasy Mini kit	Quiagen
Nukleobond AX100 Säulen	Millipore
Thermosequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit	Amersham

Western Blot Chemiluminescence	Pierce
Reagent Plus (NEN)	

2.1.11 Inhibitoren

MG132 (Proteasom-Inhibitor)	Calbiochem
-----------------------------	------------

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten

2.2.1.1 Medien und Puffer

Dulbecco's MEM (DMEM) mit Zusätzen (CCM-34):

DMEM Puvermedium (GIBCO Invitrogen Corp.)

0,0178g/l	L-Alanin
0,7g/l	Glycin
0,075g/l	L-Glutaminsäure
0,025g/l	L-Prolin
0,1mg/l	Biotin
0,025g/l	Hypoxanthin
3,7g/l	NaHCO ₃

Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 100.000 IU/l Penicillin und 0,1g/l Streptomycin.

Trypsinlösung:

8,0g/l	NaCl
0,2g/l	KCl
1,44g/l	Na ₂ PO ₄
0,2g/l	KH ₂ PO ₄
2,5g/l	Trypsin (1:250)
1,23g/l	Versen (EDTA)
0,016g/l	Phenolrot
mit 1N HCl auf pH 7,4 eingestellt	

PBS_{defic}:

0,25g/l	KCl
1,8g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
0,25g/l	KH ₂ PO ₄
10g/l	NaCl

PBS: **PBS_{defic}**

0,1g/l	CaCl ₂
0,1g/l	MgCl ₂ x 6H ₂ O

2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten

Zellen:	SK6, SK6 tet on, PK15, PK15 tet on, STE
Geräte:	Brutschränke mit CO ₂ -Begasung (Forma Scientific; Memmert)
Sterilbänke:	LaminAir (Heraeus), CleanAir
Medien:	CCM-34, Trypsinlösung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5%CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilbänken durchgeführt.

Die Passage der Zellen erfolgte mit Erreichen eines konfluenten Zellrasens. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen für 30-60sec bei RT mit 5ml Trypsin-Lösung inkubiert. Danach wurde die Trypsinlösung abgesaugt und die Zellen für 10-20min im Brutschrank inkubiert, um einen ausreichenden Abbau der extrazellulären Matrix zu gewährleisten. Anschliessend erfolgte die Aufnahme der Zellen in frisches Medium und eine Aussaat in geeigneter Verdünnung auf neuen Zellkulturschalen.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Geräte:	Neubauer Zählkammer
Lösungen:	Trypanblaulösung
	5,2mM Trypanblau
	150mM NaCl

Durch Trypsinierung in Lösung gebrachte Zellen wurden nach Resuspension in CCM-34 1:10 mit Trypanblaulösung versetzt und in eine Neubauer Zählkammer

pipettiert. Unter einem Invertmikroskop wurden 4 Grossquadrate ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellen in 4 Grossquadraten} / 4) \times 10 \times 1000$$

Blaugefärbte Zellen wurden nicht berücksichtigt, da der Übergang von Trypanblau ins Cytoplasma eine starke Einschränkung der Membranintegrität der Zelle – und somit ihren Tod – anzeigt.

2.2.1.4 Elektroporation von RNS in SK6-Zellen

Zellen:	SK6
Geräte:	BioRad Gene Pulser II Elektroporationsküvette 2mm (Molecular BioProducts) Laborfuge 400R (Heraeus)
Medien:	CCM-34, Trypsinlösung
Puffer:	PBS _{defic}

Die Elektroporation erreicht durch einen kurzen elektrischen Schock der Zellen eine Umkehrung des Membranpotentials und damit eine Störung der Funktion der Plasmamembran. Dies soll den Übergang von der Zellsuspension zugefügter RNS ins Zytoplasma mittels Diffusion ermöglichen.

Für einen Elektroporationsansatz wurden 5×10^6 Zellen nach der Ablösung durch Trypsin mit CCM-34 gewaschen (Zentrifugation bei 194xg für 2min). Daraufhin wurde ein weiterer Waschschrift in PBS_{defic} (Zentrifugation bei 194xg für 2min) durchgeführt, die Zellen in 300µl PBS_{defic} resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach Zugabe der RNS wurden die Zellen einer Spannung von 0,18kV bei 950µF und unendlichem Widerstand ausgesetzt. Daraufhin wurde der Elektroporationsansatz in CCM-34 aufgenommen und auf geeigneten Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.1.5 Transfektion linearisierter DNS in Zellen zur Generierung von Zelllinien

Zellen:	PK15, PK15 tet on, SK6 tet on
Vektoren:	pCET (linearisiert mit AvrII) pEF PAC (linearisiert mit HindIII) pTRE (linearisiert mit FspI oder PvuI)

Geräte:	Amaxa Elektroporationsküvette 2mm (Amaxa) Laborfuge 400R (Heraeus)
Medien:	CCM-34, Trypsinlösung
Puffer:	PBS _{defic} , Transfektionslösung R (Amaxa)

Das Prinzip von Amaxa beruht auf zellspezifischen Elektroporationsprotokollen, die aus einem Puffer und geeigneten Pulseinstellungen bestehen. Der Hersteller bezeichnet diese Methode auch als Nukleofektion, da neben einer besonders hohen Transfektionseffizienz auch eine Permeabilisierung der Kernmembran erfolgen soll, die wiederum die stabile Integration von DNS in das Genom der Zelle begünstigt.

Für die Transfektion wurde eine konfluente Platte der entsprechenden Zellen abtrypsinisiert. Nach Ablösung der Zellen wurden diese gezählt und auf 5×10^6 Zellen / Transfektion eingestellt. Das Waschen der Zellen erfolgte anschliessend einmal in CCM-34 und einmal in PBS_{defic} (vgl. 2.2.1.4). Daraufhin wurde das Zellpellet in 100 µl Transfektionslösung R aufgenommen und in eine 2mm Elektroporationsküvette überführt. Danach wurden zur Generierung von tet on Zellen 2,5 µg linearisierte pCET-DNS (in 10 µl H₂O), zur Generierung von spezifische Proteine exprimierenden tet on Zelllinien 2,5 µg der entsprechenden, linearisierten pTRE- und 0,25 µg pCEF-DNS zum Transfektionsansatz pipettiert. Die Küvette wurde dann in den Pulsgeber (Amaxa) verbracht und mit dem Programm X-001 behandelt. Anschliessend wurden die Zellen in den Küvetten in einem Milliliter CCM-34 resuspendiert und auf eine 10cm Schale ausgesät.

2.2.1.6 Selektion positiver Zellklone

Medien:	CCM-34 mit 100 µg/ml G418-Sulfat CCM-34 mit 100 µg/ml G418-Sulfat und 50 µg/ml Puromycin-Dihydrochlorid
---------	--

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in das entsprechende Selektionsmedium verbracht (G418-Sulfat für pCET und Puromycin-Dihydrochlorid für pCEF). Alle 4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und das Zellwachstum beobachtet. Sobald Zellkolonien unter dem Mikroskop sichtbar waren, wurde deren Lokalisation auf der Platte markiert. Daraufhin wurden die Zellen mit

einer 10µl Pipette vorsichtig abgeschabt und auf 48-Well-Schalen verbracht. Die Klone wurden unter Selektionsmedium weiter vermehrt und baldmöglichst eingefroren. Im Fall von pCET war die Resistenz gegenüber G418-Sulfat als Selektionsmerkmal ausreichend. Zellen, die mit pCEF und pTRE transfiziert worden waren, mussten zusätzlich auf die von pTRE kodierten Gene mittels Immunfluoreszenz und / oder Western Blot Analyse getestet werden.

2.2.1.7 Bestimmung des Virustiters

Zellen:	SK6
Viren:	Stamm Alfort
Medium:	CCM-34
	CCM-34 ohne FKS
	Trypsinlösung
Material:	48-Well-Schalen

Zur Bestimmung des Virustiters wurde eine 10er Verdünnungsreihe in serumfreien CCM-34 bis zur Stufe 10^6 durchgeführt. Jeweils 100µl jeder Verdünnungsstufe wurden zur Infektion von noch in Suspension befindlichen SK6 Zellen in 150µl CCM-34 in einem Well einer 48-Well-Schale verwendet. Nach 14 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte die Fixierung der Zellen und eine Färbung mittels indirektem Immunperoxidase-Assay (vgl. 2.2.1.9). Die "focus forming units" / ml Zellkulturüberstand (ffu/ml) wurden durch Auszählen von Wells mit 5-100 positiven Foci bestimmt.

2.2.1.8 Bestimmung der Empfänglichkeit

Zellen:	SK6, SK6 tet on, PK15, PK15 tet on, STE, primäre porcine Endothelzellen
Viren:	Stamm Alfort
Medium	CCM-34
	CCM-34 mit 600IU/ml IFN- α
	CCM-34 mit 5µg/ml Doxycyclin
	CCM-34 mit 1% Methylcellulose
Material:	24-Well-Schalen

Die Bestimmung der Empfänglichkeit für die Infektion mit verschiedenen KSPV erfolgte durch Ermittlung von Unterschieden in der Anzahl Antigen-positiver Zellen mit und ohne Interferon-Behandlung. Dazu wurden 5×10^4 Zellen / 24-Well am Vortag ausgesät. Je nach Versuch wurden die Zellen 16 / 8 / 6 / 4 Stunden vor der Infektion, zum Zeitpunkt der Infektion oder 4 Stunden nach der Infektion mit Interferon-haltigem CCM-34 überschichtet. Die Infektion erfolgte mit je 100µl einer Virus - Verdünnungsreihe (vgl. 2.2.1.7). 4 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel mit CCM-34 mit 1% Methylcellulose, um eine Ausbreitung von Tochtervirus im Überstand zu verhindern. Nach 24h wurden die Zellen fixiert und mittels indirektem Immunperoxidase-Assay (vgl. 2.2.1.9) das virale Antigen nachgewiesen. Die Anzahl infizierter Foci wurde in Wells mit 5-100 Foci bestimmt und die Empfänglichkeit gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Empfänglichkeit in \%} = \frac{\text{Titer behandelt}}{\text{Titer unbehandelt}}$$

2.2.1.9 Indirekter Immunperoxidase Assay

- Zellen: SK6, SK6 tet on, PK15, PK15 tet on, STE, primäre porcine Endothelzellen, primäre porcine Monozyten / Makrophagen
- Antikörper: Primärantikörper: Maus mAk A18 (anti-E2) als Hybridomüberstand 1:5 verdünnt in PBS 0,1% TWEEN 20
 Sekundärantikörper: Ziege anti-Maus Meerettich-Peroxidase-gekoppelt 1:1000 in PBS 0,1% TWEEN 20
- Lösungen: PBS 0,1% TWEEN 20
 Methanol-Aceton (1:1), gelagert bei -20°C
- Substrat: 9ml 50mM NaAcetat pH 5,2
 1ml Aminoethylcarbazol (AEC) in Dimethylformamid (4mg/ml)
 5µl H₂O₂ 30%
- Gerät: Mikroskop Eclipse TS100, Nikon

Nach geeigneten Zeiträumen nach Infektion / Transfektion wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit eiskaltem Methanol-Aceton (1:1) überschichtet und für 5min bei -20°C fixiert. Auf die Abnahme der Fixierungslösung folgte das Trocknen

der Platten an der Luft bei RT. Anschliessend wurden die Zellen mit der Erstantikörperlösung für 45min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen, schlossen sich 2 Waschschrte in PBS 0,1% TWEEN 20 bei RT an. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 45min bei 37°C im Brutschrank mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das frisch angesetzte Substrat auf die Zellen gegeben und die Reaktion nach 20min bei 37°C im Brutschrank gestoppt. Durch die Aktivität des Enzyms Meerettich-Peroxidase kommt es durch die Oxidationsreaktionen mit dem Subtrat zum Ausfallen eines roten Farbstoffes, der wiederum unter dem Mikroskop die Identifizierung von Antigen-exprimierenden Einzelzellen ermöglicht.

2.2.1.10 Isolierung von Endothelzellen aus porzinen Aorten

Lösungen: PBS

CCM-34

Gerät: Skalpellklingen Nr. 24, Schreiber

Aorten wurden direkt nach der Schlachtung im Gießener Schlachthof aus dem Geschlinge von etwa 6 Monate alten Schweinen präpariert und in PBS verbracht. Nach einer Inkubationszeit von etwa 6 Stunden in PBS konnten die Endothelzellen durch die einsetzenden Vorgänge der Autolyse durch Abschaben der Intima mittels einer Skalpellklinge sehr leicht gewonnen werden (nach Dr. Nolde, Gießen). Hierzu wurden die Aorten – nach zweimaligem Spülen mit PBS - im Bereich der dorsalen Gefäßabgänge von caudal nach cranial eröffnet und mit Kanülen auf einer sterilen Unterlage befestigt. Daraufhin wurde mit der Skalpellklinge vorsichtig über die Intima gefahren. Die so aus einer Aorta gewonnenen Zellen wurden auf eine 10cm Zellkulturschale mit CCM-34 verbracht und bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.11 Isolierung von Monozyten aus Schweineblut

Lösungen: PBS

CCM-34 10mM Hepes

Ficoll paque (GE Healthcare)

Erythrozytenlyse-Puffer

155mM NH_4Cl

10mM KHCO_3

0,13mM EDTA

Gerät: Laborfuge 400R (Heraeus)

7 und 25ml Teflonbeutel (Cellgenix)

Frisches Schweineblut wurde aus einem etwa 6 Monate alten Tier am Schlachthof Gießen gewonnen, mit 0,3% EDTA versetzt und sofort ins Labor verbracht. Jeweils 50ml Vollblut wurden in 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10min bei 2200 x g und 20°C bei ausgeschalteter Bremse in Zell- und Plasmafraktion getrennt. Aus jedem Zentrifugenröhrchen wurde der buffy coat – eine Zentrifugationsphase zwischen Erythrozyten und Plasma, die vor allem Immunzellen und Thrombozyten enthält – in 5-10ml Volumen in ein neues, steriles 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der buffy coat aus je 2 Röhrchen wurde dabei gepoolt und mit PBS auf 30ml Volumen aufgefüllt. Danach erfolgte eine Unterschichtung mit 15ml Ficoll paque und ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30min bei 1200 x g, 20°C, mit ausgeschalteter Bremse. Nachfolgend wurde die Interphase abpipettiert und in 45ml PBS bei 400 x g, 20°C, für 10min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5ml Erythrozytenlyse-Puffer für 5min bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in 45ml PBS bei 400 x g, 20°C, für 10min wurde das Zellpellet in 10ml CCM-34 10mM Hepes resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. In die sterilen Teflonbeutel wurden je 5×10^6 Zellen/ml Medium gefüllt und diese für 7d bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgte die Differenzierung der Monozyten zu Promakrophagen, so dass danach eine Aussaat auf Zellkulturschalen erfolgen konnte. Die in der Präparation enthaltenen Lymphozyten konnten nach erfolgter Anheftung der Makrophagen durch Mediumwechsel und einen Waschschrift entfernt werden.

2.2.1.12 Virale Wachstumskurven

Für die Bestimmung der viralen Vermehrung wurde eine definierte Anzahl an Zellen durch Elektroporation mit definierten RNS-Mengen transfiziert oder mit einer spezifischen MOI infiziert. Nach festgelegten Zeitpunkten wurde ein Teil des Überstands abgenommen und die Infektiosität im Überstand durch Titration bestimmt.

2.2.1.13 Bestimmung der RNS-Infektiosität

Material: 24-Well-Schalen
CCM-34
CCM-34 mit 1% MC
PBS_{defic}
SK6- und PK15- Zellen
IFN- α (human)
Gerät: BioRad Gene Pulser II

Zur Bestimmung der RNS-Infektiosität wurden 1×10^5 SK6- und PK15- Zellen mit verschiedenen Mengen an Transkript-RNS ($1 \mu\text{g} - 10^{-5} \mu\text{g}$) mittels Elektroporation transfiziert. Ein Teil der PK15-Zellen wurde 16h vor Transfektion mit 600IU/ml IFN- α behandelt. Nach der Transfektion wurden die Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät und 4h später wurde das Medium durch 1% MC enthaltendes Medium ersetzt. 24h später erfolgte die Fixierung der Zellen und die Anzahl der virales Antigen exprimierenden Zellen wurde nach immunhistochemischer Färbung bestimmt, wenn sie zwischen 1 und 500 lag. Aus allen auswertbaren Wells wurde der Mittelwert gebildet und auf Antigen-positive Zellen / $1 \mu\text{g}$ RNS umgerechnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium: 10g/l Trypton
5g/l Hefeextrakt
10g/l NaCl
mit 1N NaOH auf pH 7,5 eingestellt

Substanzen: Agar-Agar (DIFCO), Ampicillin (Fluka)

Gerät: Schüttler (Infors)

Vor Verwendung wurden alle Medien autoklaviert. Feste Nährböden zur Heranzucht von Einzelkolonien wurden durch Zugabe von 1,5% Agar-Agar hergestellt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Brutschränken bei 37°C über Nacht, Flüssigkulturen wurden dabei mit etwa 200rpm geschüttelt. Die Selektion auf Plasmidaufnahme der Bakterien erfolgte durch Zusatz von 25-50µg/ml Ampicillin zum Medium.

2.2.2.2 Plasmidisolierung

2.2.2.2.1 Minipräparation

Lösungen:	P1+RNase	50mM	Tris-HCl, pH8,0
		0,1mg/ml	RNaseA
	P2	0,2M	NaOH
		1%	SDS
	P3	2,55M	Kaliumacetat, pH 5,5
	Isopropanol		
	70% Ethanol		
	H ₂ O _{bidest} (Roth)		
Gerät:	Biofuge Pico (Heraeus)		

Die Minipräparation dient der Gewinnung kleinerer DNS-Mengen (bis 10µg). Sie wurden mittels alkalischer Lyse durchgeführt. Hierzu wurden 2,5ml einer Bakterienkultur über Nacht inkubiert. 2ml der Kultur wurden bei etwa 10.000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es erfolgte eine Resuspension des Bakterienpellets in 200µl P1 + RNase. Anschliessend wurden 200µl P2 hinzugegeben und nach vorsichtigem Schwenken 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200µl P3 und gründlicher Durchmischung wurde eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 500µl Isopropanol vermischt. Hierauf erfolgte die Fällung der DNS durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 3min. Nach einem weiteren Waschschrift mit 70% Ethanol für 1min bei 10.000 x g wurde die DNS luftgetrocknet und in 25-50µl H₂O_{bidest} gelöst.

2.2.2.2.2 Midipräparation (Machery & Nagel)

Lösungen:	P1+RNase		
	P2		
	P3		
	N2	100mM	Tris
		900mM	KCl
		15%	Ethanol, Fluka
		mit H ₃ PO ₄ auf pH 6,3 eingestellt	
	N3	100mM	Tris
		1150mM	KCl
		15%	Ethanol, Fluka
		mit H ₃ PO ₄ auf pH 6,3 eingestellt	
	N5	100mM	Tris
		1000mM	KCl
		15%	Ethanol, Fluka
		mit H ₃ PO ₄ auf pH 8,5 eingestellt	
	Isopropanol		
	70% Ethanol		
	H ₂ O _{bidest} , Roth		
Verbrauchsmaterial:	Nukleobond AX 100 Säulen, Machery & Nagel		
Gerät:	Laborfuge 400R, Heraeus		
	Biofuge Pico, Heraeus		

Um größere DNS Mengen aus Übernachtskulturen von 50-100ml zu präparieren, wurden Nukleobond AX 100 Säulen verwendet. Durch Zentrifugation bei 3939 x g für 20min in 50ml Röhrchen wurde ein Bakterienpellet gewonnen und dieses nach Abschütten des Überstandes in 5ml P1 + RNase resuspendiert. Daraufhin wurden 5ml P2 hinzupipettiert, der Ansatz durch vorsichtiges Schwenken gemischt und für 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5ml P3 wurde die Probe gut durchmischt und bakterielle chromosomale DNS sowie Proteine für 5min bei 3939 x g von der wässrigen Phase getrennt. Währenddessen wurde die Nukleobond AX 100 Säule mit 2,5ml N2 äquilibriert und der Vorfilter durch Anfeuchten mit P3 vorbereitet. Nun

wurde die wässrige Phase durch den Vorfilter auf die Säule gegeben. Nach 2 Waschschritten mit je 10ml N3 erfolgte die Elution der Plasmid DNS von der Säule mit 3ml N5. Je 1ml des Eluats wurden mit 700µl Isopropanol versetzt und die DNS bei 10.000 x g für 3-5min gefällt. Danach wurde das Pellet in 350µl 70% Ethanol bei 10.000 x g für 1 min gewaschen und nach dem Trocknen in 15-25µl H₂O_{bidest} gelöst.

2.2.2.3 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Bakterien: *E. coli* K12-Stamm HB 101

Lösungen:	TFB 1:	30mM	KOAc
		100mM	RbCl
		10mM	CaCl ₂
		50mM	MnCl ₂
		15%	Glyzerol

mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt und
sterilfiltriert

TFB 2:	10mM	MOPS
	75mM	CaCl ₂
	10mM	RbCl
	15%	Glyzerol

mit KOH auf pH 6,5 eingestellt und sterilfiltriert

Als Kompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien verstanden, frei in der Umgebung vorliegende DNS aufzunehmen. Nur wenige Bakterien weisen diese Fähigkeit natürlicherweise auf. Jedoch können *E.coli* durch Behandlung mit CaCl₂ und Hitzschock kompetent gemacht werden. Hierzu wurden 250ml LB-Medium mit 2,5ml Übernachtskultur angeimpft. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C unter Schütteln bis eine OD600 von 0,5-0,6 erreicht wurde. Nun wurden die Bakterien bei 3.939 x g für 5min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 100ml eiskaltem TFB 1 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5min auf Eis erfolgte ein erneutes Abzentrifugieren der Bakterien (3.939 x g, 5min, 4°C), woraufhin das Pellet in 10ml eiskaltem TFB 2 aufgenommen und für 1h auf Eis inkubiert wurde. Die Bakterien wurden in 250µl Aliquots aufgeteilt und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut. Danach wurden 50µl kompetente Bakterien mit etwa 50ng Plasmid-DNS oder 10µl Ligationsansatz

vermischt und für 20min auf Eis inkubiert. Der Hitzschock wurde bei 37°C für 1,5min durchgeführt und die Bakterien danach für 2-3min erneut auf Eis gelagert. Hierauf wurden 250µl LB-Medium ohne Ampicillin zum Transformationsansatz gegeben, dieser für 20-30min bei 37°C geschüttelt und dann auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei 37°C für 12-14h über Nacht. Einzelkolonien wurden dann zum Animpfen von Mini- und Midipräparationen verwendet.

2.2.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNS und RNS

Lösungen:	Phenol, Appligene Chloroform, Fluka
Gerät:	Biofuge Pico, Heraeus

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wird zur Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen verwendet. Hierzu wurde ein Volumen der zu reinigenden Lösung mit je 0,6 Volumenteilen Phenol und Chloroform versetzt. Nach gründlichem Mischen für mind. 30sec auf dem Vortexer wurden die Phasen durch Zentrifugation (10.000 x g, 1min, RT) getrennt. Die obere Phase, in der sich die Nukleinsäuren befinden, wurde vorsichtig von der Interphase (enthält den Grossteil der Proteine) abgenommen und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Eine weitere Reinigung erfolgte durch Fällung der Nukleinsäuren (s. 2.2.2.5)

2.2.2.5 Präzipitation von DNS / RNS mit Ethanol

Lösungen:	100% Ethanol 3M NaAcetat, pH 5,2 70% Ethanol H ₂ O _{bidest}
Gerät:	Biofuge Pico, Heraeus

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe des 2,5 fachen Volumens 100% Alkohol und 1/10 des Volumens 3M NaAcetat-Lösung bei 10.000 x g für 3-5min. Danach schloss sich ein Waschschriff mit 70% Ethanol für 1min bei 10.000 x g an. Das Nukleinsäurepellet wurde nach dem Trocknen in H₂O_{bidest} gelöst.

2.2.2.6 Quantifizierung von DNS / RNS

Gerät: Phosphospektrophotometer GeneQuant II, Pharmacia

Zur Ermittlung des DNS- / RNS-Gehaltes einer Lösung wurde die Absorption bei 260nm in einer Quarzglasküvette photometrisch bestimmt. Die zu messende Nukleinsäurelösung wurde zuvor in einem Volumen von 150µl H_2O_{bidest} 1:100 verdünnt. Die Messung von H_2O_{bidest} diente der Bestimmung des Nullwertes, gegen den gemessen wurde.

Da 1 OD₂₆₀ etwa 50µg/ml DNS bzw. 40µg/ml RNS entspricht, kann durch folgende Formeln aus der OD₂₆₀ die Konzentration der Lösung kalkuliert werden:

DNS-Konzentration (µg/ml) = Messwert OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 50

RNS-Konzentration (µg/ml) = Messwert OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 40

2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Lösungen:	6x DNS-/RNS-Ladepuffer	0,25%	Bromphenolblau
		30%	Glyzerin (v/v)
	50x TAE-Puffer	242g	Tris
		57,1ml	Eisessig
		100ml	EDTA, 1,5M, pH 8
	mit H_2O_{bidest} auf 1l aufgefüllt		
	Ethidiumbromidlösung 10mg/ml		
Substanzen:	1kb-DNS-Leiter, Invitrogen, als Längenstandard		
	Agarose, Invitrogen		
Gerät:	Nukleinsäure Elektrophoresekammern, Eigenbau JLU Gießen		

Zur Auftrennung von DNS- und RNS Fragmenten wurden 0,8% Agarosegele (w/v) verwendet. Hierzu wurden Gele in Formen gegossen und nach dem Aushärten in Kammern mit 1xTAE-Puffer mit 188µg/l Ethidiumbromid gelegt. Zur Herstellung der Agaroselösung wurden 3,2g Agarose mit 400ml 1xTAE mit Ethidiumbromid vermischt, in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst und dann bei 55°C gelagert. Die Proben wurden mit 1/10 ihres Volumens Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurden 5µl einer 1kb-DNS-Leiter mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte horizontal bei konstanter Spannung

(Feldstärke 4-8V/cm). Zur Analyse oder Gewinnung der DNS-/RNS-Fragmente wurde das Gel auf einen Transilluminator verbracht. Die Nukleinsäurefragmente konnten durch die Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids optisch wahrgenommen, photographisch dokumentiert und aus dem Gel ausgeschnitten werden.

2.2.2.8 Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Material: Ultrafree – DA Säulen, Millipore
DNA Gel Extraction kit, Quiagen
Gerät: Biofuge Pico, Heraeus

Zur Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen wurden 2 verschiedene Kits verwendet. Mittels Ultrafree – DA Säulen können DNS-Fragmente von 100-10.000 Basenpaaren aus Agarosegelen gewonnen werden. Hierzu wird das Gel-Fragment auf die Säule ("gel nebulizer") geladen und für 10min bei 5000 x rpm zentrifugiert. Feste Gelbestandteile werden hierbei zurückgehalten, so dass das Zentrifugat aus DNS und Agarosegelpuffer besteht.

Das DNA Gel Extraction kit wurde zur Aufreinigung größerer Vektoren oder schwer zur klonierender Fragmente verwendet. Hierbei wird die DNS nach Schmelzen des Agarosestücks bei 50°C an eine Säule gebunden, mehrfach gewaschen und dann mit H₂O_{bidest} eluiert.

2.2.2.9 Ligation von DNS-Fragmenten

Enzyme: Restriktionsendonukleasen, New England Biolabs
Antarctic Phosphatase, New England Biolabs
T4-DNS-Ligase, New England Biolabs
Lösungen: 10x T4-DNS-Ligase-Puffer, New England Biolabs

Zu ligierende DNS-Fragmente wurden nach Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen durch Agarosegelelektrophorese mit nachfolgender Aufreinigung (s. 2.2.2.8) gewonnen. Vektorplasmide wurden vor Einsatz in die Ligationsreaktion mit Antarctic Phosphatase bei 37°C für 30min inkubiert und das Enzym danach bei 65°C für 5min inaktiviert, um eine Religation des Vektors zu verhindern, falls nur mit einer Restriktionsschnittstelle oder einem glatten Ende

gearbeitet wurde. Die eigentliche Ligationsreaktion wurde in 10µl Volumen bei RT für 30min - 2h durchgeführt, wobei Vektor und Insert mit komplementären Enden im Verhältnis 1:3 eingesetzt wurden. Bei der Ligation katalysiert die T4-DNS-Ligase Phosphodiesterbindungen zwischen den 3' OH- und 5' PO₄-Gruppen von doppelsträngiger DNS unter Verbrauch von ATP.

2.2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Enzyme:	<i>Pfu</i> -DNS-Polymerase, Stratagene
Lösungen:	10x <i>Pfu</i> -Puffer, Stratagene
	10mM dNTPs, Roche
	100µM Plus- und Minusstrangprimer, Operon
Gerät:	PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Perkin-Elmer
	PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Eppendorf

Die PCR erlaubt die Vervielfältigung von spezifischen DNS-Fragmenten, auch wenn die zu vervielfältigende DNS nur in geringen Mengen vorliegt. Hierzu wird die DNS durch Erhitzen auf 94°C für 5min in Einzelstränge aufgespalten. Danach erfolgt eine Temperaturreduktion auf 60°C +/-8°C – je nach Schmelztemperatur der Primer – um die Anlagerung der Primer an die DNS-Einzelstränge zu ermöglichen. Die Primer sind kleine Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden DNS-Abschnitt einrahmen und somit die Vervielfältigung von spezifischen DNS-Abschnitten ermöglichen. Nach der Anlagerung der Primer an die Einzelstränge erfolgt die Phase der Neusynthese der DNS durch die DNS-abhängige DNS-Polymerase bei 72°C und 2min / kb. Danach beginnt der Zyklus durch Erwärmung auf 94°C zur Trennung der Doppelstränge von vorne.

Standardmäßig wurde die PCR-Reaktion wie folgt angesetzt (50µl Reaktionsvolumen):

10x <i>Pfu</i> -Puffer	5µl
10mM dNTPs	1µl
Plus- und Minusstrangprimer	je 0,5µl
DNS-template (50ng/µl)	1µl
<i>Pfu</i> -DNS-Polymerase	1µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50µl

Standard-PCR

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	5min	94°C
Denaturierung	25-30x	30sec	94°C
Anlagerung der Primer		1min	60°C +/- 8°C
Elongation		2min / kb	72°C
Elongation	1x	7min	72°C

Zur Kontrolle der Reaktion wurde 1µl des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.2.11 Klonierung von PCR-Produkten

Enzyme:	DpnI, New England Biolabs
	Restriktionsendonukleasen, New England Biolabs
	T4-DNS-Ligase, New England Biolabs
	T4-Polynukleotidkinase, New England Biolabs
Substanzen:	10mM ATP, Roche
Material:	PCR Purification kit, Quiagen

Um die Matrizen-DNS aus dem PCR-Ansatz zu entfernen, wurde dieser mit 1µl DpnI für 1h bei 37°C inkubiert, da dieses Enzym nur methylierte DNS (d.h. in Bakterien synthetisierte DNS), verdaut. Handelte es sich bei dem Ansatz um eine Religations-PCR, wurden zusätzlich noch 5µl ATP und 0,5µl T4-Polynukleotidkinase zu 50µl PCR-Reaktionsvolumen gegeben, um eine Phosphorylierung der DNS-Enden zu gewährleisten. Wenn das PCR-Fragment in einen Vektor gesetzt werden sollte, wurde die Reaktion nach dem DpnI-Verdau durch das PCR-Purification kit mittels Bindung an eine Säule aufgereinigt und die DNS in 30µl H₂O_{bidest} eluiert. Im Anschluss erfolgte der Verdau mit den zum Vektor kompatiblen Restriktionsendonukleasen und eine Aufreinigung über Agarosegelelektrophorese zur Isolierung des gewünschten Fragments. Das weitere Vorgehen bei der Ligation erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.9 beschrieben.

2.2.2.12 Ortsgerichtete Mutagenese

Enzyme:	DpnI, New England Biolabs
	<i>Pfu</i> -DNS-Polymerase, Stratagene

Lösungen:	10x <i>Pfu</i> - Puffer, Stratagene 10mM dNTPs, Roche 100µM Plus- und Minusstrangprimer, Operon
Gerät:	PCR-Maschine DNA Thermal Cyclers 2400, Perkin-Elmer PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Eppendorf

Bei der ortsgerichteten Mutagenese werden einzelne Basenaustausche durch Plus- und Minusstrangprimer, die den gewünschten Nukleotidaustausch kodieren, in ein Plasmid eingefügt. Um eine korrekte Amplifikation der DNS zu gewährleisten wurde *Pfu*-DNS-Polymerase verwendet, da sie über eine "proof-reading" Aktivität verfügt. Der Ansatz und die Durchführung der PCR erfolgte wie unter 2.2.2.10 beschrieben. Danach wurde die Matrizen-DNS durch DpnI-Verdau abgebaut (s. 2.2.2.11). Da sich das Primerpaar direkt gegenüber liegt, ist die neusynthetisierte DNS zirkulär und doppelsträngig, weist aber zwei versetzte Einzelstrangbrüche ("nicks") auf. Diese werden jedoch durch Ligation bei der Transformation in Bakterien geschlossen. Für die Transformationsreaktion wurden 1-3µl des PCR-Ansatzes eingesetzt.

2.2.2.13 In vitro Transkription

Enzyme:	Smal, New England Biolabs SP6-RNS-polymerase, New England Biolabs TuboDNase, Amplicon
Lösungen:	10xSP6-Polymerase-Puffer, New England Biolabs 0,1M DTT, Fermentas RNaseOut, Invitrogen 10mM rNTPs, New England Biolabs H ₂ O _{bidest}

Für die Transkription wurden 2,5µg zirkuläre Plasmid-DNS mit der Restriktionsendonuklease Smal bei RT für 1h linearisiert. Die Überprüfung des Verdau erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Daraufhin wurde die DNS durch Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.2.4) und Ethanol-Fällung (2.2.2.5) gereinigt und in 10µl H₂O_{bidest} (RNase-frei) gelöst.

Transkriptionsansatz:

10x SP6-Polymerase-Puffer	1µl
0,1M DTT	1µl
10mM rNTPs	1µl
linearisierte DNS (0,25µg/µl)	1µl
SP6-RNS-Polymerase	0,5µl
RNaseOUT	0,5µl
H ₂ O _{bidest}	7µl

Dieser Ansatz wurde für 0,5-1,5h bei 37°C inkubiert und die RNS-Produktion durch Agargelelektrophorese kontrolliert und die Mengen abgeschätzt. Sollte eine genaue Messung der RNS erfolgen, wurde 1µl TurboDNase zum Transkriptionsansatz hinzugegeben und die DNS für 30min bei 37°C abgebaut. Danach erfolgte eine Aufreinigung der RNS durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung. Daraufhin konnte die enthaltene RNS-Menge photometrisch bestimmt werden (vgl. 2.2.2.6).

2.2.2.14 Sequenzierung von DNS mittels "Cycle Sequencing" mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern

Reagenzien:	"Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-GTP", Amersham Fluoreszenzfarbstoff (IR-800) – markierte Primer (2pmol/µl)
Gerät:	PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Perkin-Elmer PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Eppendorf

Die Sequenzierung wurde als PCR durchgeführt. Jedoch kam es durch die Verwendung nur eines Primers zu einer linearen Amplifikation der Fragmente.

Zuerst wurde 1µl Primer mit 300ng/kb Plasmid-DNS versetzt und mit H₂O_{bidest} auf 25µl Volumen gebracht. Je 6µl dieses Gemisches wurden in 4 PCR-Gefäße pipettiert und mit 2µl der verschiedenen Didesoxynukleotide gemischt.

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	2min	95°C
Denaturierung	30x	15sec	95°C
"annealing"		20sec	50°C
Elongation		30sec	70°C
Elongation	1x	5min	70°C

Nach Ende der PCR-Reaktion wurden 4µl Stop-Puffer zur Reaktion gegeben und die Ansätze bei 4°C aufbewahrt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Reaktionen durch Erhitzen auf 72°C für 2min denaturiert. Das Gel wurde mit je 1,5µl / Ansatz beladen. Durch die Fluoreszenzmarkierung des Primers konnte bei der Auftrennung der Reaktionen auf dem Gel die Größe der unterschiedlichen Fragmente durch Anregung mittels Laser detektiert werden.

2.2.2.15 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen

Lösungen: 10x "long run"-Puffer 162,0g Tris
 27,5g Borsäure
 9,3g EDTA-Na₂
 mit H₂O_{bidest} auf 1l aufgefüllt

1 Gel (6%, 40cm): 30ml SequaGel XR Monomer Solution
 7,5ml SequaGel Complete Buffer
 300µl 10%-iges APS
 400µl DMSO

Gerät: Sequenzelektrophoreseapparaturen, LICOR
 Sequenziergerät LICOR 4000L, LICOR

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf 0,2mm dicken Polyacrylamid-Gelen. Bei einer Gellänge von 40cm konnte etwa 700 Basen weit gelesen werden. Für die Herstellung der Gele wurden Spacer zwischen Glasplatten gelegt und diese dann in entsprechende Apparaturen eingespannt. Danach wurde das Gel horizontal durch einen Sterilfilter (0,45µm) gegossen. Nach durchschnittlich 30min war das Gel polymerisiert und konnte in das Sequenziergerät verbracht werden. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel unter folgenden Bedingungen erwärmt: 1.500V,

37mA, 50°C, 50W. Der eigentliche Gellauf erfolgte nach Auftragen der Proben unter gleichen Konditionen wie das Warmlaufen für 8-10h. Hierbei wurden die Fluoreszenzfarbstoff-markierten DNS-Banden während des Laufes durch einen computergesteuerten Laser ausgelesen und im Anschluss automatisch sequenziert (BaselImage Software). Somit standen die Daten als Bild- und Buchstabensequenzen zur Analyse zur Verfügung (DNA Strider).

2.2.2.16 Isolierung von Gesamt-RNS mittels RNeasy

Zellen: PK15, SK6, SK6tet, STE

Material: RNeasy Mini kit

Gerät: Biofuge Pico, Heraeus

Zur Isolation der Gesamt-RNS wurden Zellen auf 6-Well-Platten angezüchtet. Nach Abnahme des Mediums wurden 350µl/Well des Lysis-Puffers RLT hinzugegeben und die Zellen für 2min bei RT lysiert. Der Puffer wurde daraufhin in eine QuiaShredder-Säule überführt und 1min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde mit 350µl 70% Ethanol vermischt und in eine RNeasy-Säule pipetiert. Auf einen Zentrifugationsschritt von 15sec bei 8.000 x g folgte 1 Waschschrift mit 700µl RW1 und 2 Waschschriffe mit je 500µl RPE für je 15sec bei 8.000 x g. Im Anschluss wurde die Säule für 2min bei 10.000 x g getrocknet und die RNS in 30µl H₂O_{bidest} (RNase-frei) bei 8.000 x g für 1min eluiert.

2.2.2.17 Generierung und Amplifikation von cDNS

Enzyme: SuperScript RT II, Invitrogen

Taq-Polymerase, Biotherm

Lösungen: 5x RT-Puffer

0,1M DTT

10mM dNTPs

10x Taq-Puffer

Plus- und Minusstrangprimer (100µM)

RNaseOUT, Invitrogen

H₂O_{bidest} (RNase-frei)

Gerät: PCR-Maschine DNA Thermal Cycler 2400, Perkin-Elmer
PCR-Maschine Mastercycler Gradient, Eppendorf

Zur Herstellung von cDNS aus viraler oder zellulärer RNS wurden 5µl einer Präparation zellulärer RNS (s. 2.2.2.16) eingesetzt. Für die reverse Transkription wurde die RNS mit 1µl Minusstrang - Primer versetzt und mit H₂O_{bidest} auf 10µl Gesamtvolumen gebracht. Dieser Ansatz wurde für je 2 min bei 94°C, 72°C, 56°C und 42°C inkubiert und danach 10µl RT-Mix hinzugegeben und für 1h bei 42°C die eigentliche Reaktion durchgeführt.

RT-Mix (für eine Reaktion):	5x RT-Puffer	4µl
	0,1M DTT	2µl
	10mM dNTPs	1µl
	RNaseOUT	0,5µl
	SuperScript RT II	0,75µl
	H ₂ O _{bidest}	2µl

Nach Beendigung der reversen Transkription wurden 5µl des Ansatzes für die Amplifikation mittels PCR verwendet. Der Reaktionsansatz erfolgte entsprechend 2.2.2.10, jedoch wurden 10x Taq-Puffer und Taq-Polymerase verwendet. Die Amplifikation erfolgte für 30 Zyklen bei einer Elongationszeit von 1min / kb. Danach wurde die DNS-Synthese durch Agargelelektrophorese kontrolliert.

2.2.2.18 Klonierung von PCR-Fragmenten in pGEM-T

Material: pGEM-T vector systems kit, Promega

Zur Amplifikation und leichteren Klonierung wurden die in 2.2.2.17 gewonnen cDNA-Fragmente in den Vektor pGEM-T ligiert. Dies ist für mit der Taq-Polymerase generierte PCR-Fragmente ohne die Verwendung von Schnittstellen möglich, da diese Polymerase an den 3' Enden jeweils ein Adenosin anfügt. Der Vektor pGEM-T liegt linearisiert mit EcoRV und je einem freien Thymidin an den 3' Enden vor.

In den Ansatz wurden 5µl 2x Rapid Ligation Puffer, 4µl PCR-Produkt, 0,5µl pGEM-T und 0,5µl T4-DNS Ligase eingesetzt und für 1-8h bei RT ligiert.

Danach wurde die Ligation in Bakterien transformiert. Positive Klone konnten für weitere Klonierungen oder für die Sequenzierung verwendet werden.

2.2.3 Klonierungen

2.2.3.1 Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz	Länge Schnittstelle /	+/-
E ^{ms} S476Rs	GAGGCAGCTCAGAACCGCAGGG	22nt	+
CST61	GAGCCATGGTCCACTTACAG	20nt	+
CST75	GGCATAGGCACCAAACC	17nt	-
CSF8617 rev	CCGCTTTCATCCTGTAACC	19nt	-
CST132	TTTGCGGCCGCCCAGACATGATAAGATACATTG	33nt / <i>NotI</i>	+
CST133	AAAAGATCTTCGGCTGCTACAGGCTGGTACAGC	33nt / <i>BglII</i>	-
c46	GCAACTGGTTACCCATAATG	20nt	-
c88	CTTCTCATGCTCCCTAGGGGCTATCTTC	28nt / <i>AvrII</i>	
c91	TCCGATGACGGCGCAAGT	18nt	+
c118	GGAAAGGTGACRCTAGGAGTGGCAAC	26nt	+
c119	GTTGCCACTCCTAGYGTACCTTTCC	26nt	-
c123	GCCCAGTTCGCCGAGGTGACTAAG	24nt	+
c124	CTTAGTCACCTCGGCGAACTGGGC	24nt	-
c146	GTAACCAGTTGCTCCGGCGCAAGTGGCAGC	30nt	+
c147	GCTGCCACTTGCGCCGGAGCAACTGGTTAC	30nt	-
c148	GTAACCAGTTGCTCCAAGGATAAGAAGCCAG	31nt	+
c149	CTGGCTTCTTATCCTTGGAGCAACTGGTTA	31nt	-
c150	GTAACCAGTTGCTCCAAGAAGCCAGACAGA	30nt	+
c151	TCTGTCTGGCTTCTTGGAGCAACTGGTTAC	30nt	-
c152	GTAACCAGTTGCTCCCCAGACAGAATGAAC	30nt	+
c153	GTTCAATTCTGTCTGGGGAGCAACTGGTTAC	30nt	-
c211	AACTCGAGTCACCAAGCCAACAGGGCCTTTT	30nt / <i>XhoI</i>	-
c212	AACTCGAGTCAAGCCAACAGGGCCTTTTTT	29nt / <i>XhoI</i>	-
c213	AACTCGAGTCACAGGGCTTTTTCTAGTTTC	30nt / <i>XhoI</i>	-
c216	TCAGAAAAAGCCCTGTTGGC	20nt	+
c217	TTTAAGCTTACCATGTCCGATGACGGCGCAAG	32nt / <i>HindIII</i>	+
c218	AAATCTAGATCACGCCAAGCCAACAGGG	29nt / <i>XbaI</i>	-
c220	CATGGGGCCGCGGAGGCTGGATC	23nt	-
c221	GACTACAAGGACGACGATGACAAG	24nt	+
c237	TTCTCGAGCTAATTATGGTACAGGC	25nt / <i>XhoI</i>	-
c247	AACTCGAGTCACAACAGGGCTTTTTCTAG	31nt / <i>XhoI</i>	-
c248	AACTCGAGTCAGGCTTTTTCTAGTTTCTTC	30nt / <i>XhoI</i>	-
c249	AACTCGAGTCATTTTTCTAGTTTCTTCCTG	30nt / <i>XhoI</i>	-
c250	AACTCGAGTCATAGTTTCTTCCTGGACTCTG	31nt / <i>XhoI</i>	-
c251	TTTGCGCGCTCCGATGACGGCGCAAGTG	28nt / <i>BssHII</i>	+
c252	AAAGCGCGCTTTTTCTAGTTTCTTCCTG	28nt / <i>BssHII</i>	-
c255	TTCTCGAGTCACTTCCTGGACTCTGGTG	28nt / <i>XhoI</i>	-
c256	AACTCGAGTCAGGACTCTGGTGGCTTGTTG	30nt / <i>XhoI</i>	-
c259A	TTTGCGCGCATGGTGAGCAAGGGCGAG	27nt / <i>BssHII</i>	+
c260A	TTTGCGCGCATGGTGAGCAAGGGCGAG	29nt / <i>BssHII</i>	-
c326	TTTACTAGTTGCTCCGACACACAAAGAT	28nt / <i>SpeI</i>	+
c357	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA	25nt	+
R13	GCAACTGGTTACCCATAATGGAC	23nt	-
R14	ATCCTTGCTGCCACTTGCGCCG	22nt	-
R19	CTAGAAAAAGCCCTGTTGGCTTG	23nt	+
R20	CTTGTAAGCTCGTCCATGCCGAG	24nt	-
R21	GCCACTTGCGCCGTCATCGGAG	22nt	-
R22	TGCGCCGTCATCGGAGCAACTG	22nt	-

R23	GTCATCGGAGCAACTGGTTAC	21nt	-
R25	GCCGCAGCTGGCAGCAAGGATAAG	24nt	+
R26	CGCAGCGGCGCAACTGGTTACCCA	24nt	-
R27	CGCAGCGGAGCAACTGGTTACCCA	24nt	-
R31	AGCTGCGGCCGCGAGCGGAGC	20nt	-
R32	GACGGCGCACTAGAAAAAGCCCTG	24nt	+
R33	CAGGGCTTTTTCTAGTGCGCCGTC	24nt	-
R34	TATGTGTGCGTCCGTGGTTGCATACTG	27nt	+
R35	CAGTATGCAACCACGGACGCACACATA	27nt	-
R36	CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTC	24nt	-
R42	GTAACCAGTTGCTCCTCGGGGCCAGACAGAATG	33nt	+
R43	CATTCTGTCTGGCCCCGAGGAGCAACTGGTTAC	33nt	-
R88	GGAGTAAAATACCAAATCAAAAAG	24nt	+
R89	GGCATCAGGAGGCTTGGTCTTG	22nt	-
R90	GCTCAGTCTCAGGGAAGAACACACAAGAC	29nt	+
R91	CTGACCCTGAGATTTGGTATTTTACTCCCTC	31nt	-
R92	GGGAAGAACACACAAGACGGCCTG	24nt	+
R93	GATTTGGTATTTTACTCCCTCTAC	24nt	-
R105	GGGGGCTATCTTCAACTTAC	20nt	-
R106	AGCAAGACCAAGCCTCCTGATG	22nt	+
R107	ACCAAGCCTCCTGATGCAAC	20nt	+
R108	GCAACGATTGTAGTAGAGGGAG	22nt	+
R109	CTCTACTACAATCGTTGCATCAG	23nt	-
R110	AACACACAAGACGGCCTGTAC	21nt	+
R111	GGCCTGTACCATAATAAGAACAAG	24nt	+
R112	GTTCTTATTATGGTACAGGCCGTC	24nt	-
R118	GGACCCAGGATACCAAGGCACC	22nt	+
R119	GGTGCCTTGGTATCCTGGGTCC	22nt	-

2.2.3.2 Modifikation des Core-Proteins

Verkürzungen wurden in das Core-Protein durch die Anwendung von PCRs auf dem p447-Vorklon p842 (kodiert für die p447 Strukturproteine) eingefügt. Nach Ligation der PCR-Produkte und Amplifikation der Plasmide in Bakterien wurde das modifizierte Core-Fragment über Klonierung mittels *XhoI* / *SbfI* in das p447 ligiert. Zuvor wurde die Basenabfolge mittels Sequenzierung überprüft.

Konstruktbeschreibung	Plasmid	Primer
p447 _{Δ170-171}	p992	c146 / c147
p447 _{Δ170-176}	p1001	c148 / c149
p447 _{Δ170-178}	p1005	c150 / c151
p447 _{Δ170-180}	pCR115	c152 / c153
p447 _{Δ170-178SG}	pCR172	R42 / R43
p447 _{Δ208-212}	pCR226	R88 / R89
p447 _{Δ219-225}	pCR228	R92 / R93
p447 _{Δ194-198}	pCR255	R106 / R105
p447 _{Δ194-200}	pCR256	R107 / R105
p447 _{Δ194-206}	pCR257	R108 / R105
p447 _{Δ213-225}	pCR258	R92 / R109
p447 _{Δ219-227}	pCR259	R110 / R93

p447 _{Δ219-231}	pCR260	R111 / R93
p447 _{Δ239-246}	pCR261	R19 / R112
p447 _{Δ213-246}	pCR286	R19 / R109
p447 _{Δ219-246}	pCR287	R19 / R93
p447 _{Δ213-227}	pCR288	R110 / R109
p447 _{Δ213-231}	pCR289	R111 / R109

Zusätzliche Core-Sequenzen wurden durch Insertion des Core-Gens über eine *BssHII*-Schnittstelle in den Vorklon gesetzt. Die Klonierung des YFP-Gens zwischen zwei Core-Gene erfolgte mittels der Schnittstellen *BssHII* und *MluI*.

Konstruktbeschreibung	Plasmid	Primer / Klonierung
p447 _{CC}	p952	c91 / c252 + c251 / c46
p447 _{CCC}	p983	c251 / c252 <i>BssHII</i>
p447 _{cYc}	p992	c259A / c260A <i>BssHII</i>
p447 _{cYYc}	p1001	c259A / c260A <i>BssHII</i>
p447 _{cYYYc}	p1005	c259A / c260A <i>BssHII</i>
p447 _{BVDVcYc}	p1203	c326 / c88

Verkürzungen der Core-kodierenden Bereiche in p447_{cYc} wurden durch PCR eingefügt und durch Klonierungen mittels *BspEI* und *SdaI* kombiniert.

Konstruktbeschreibung	Plasmid	Primer / Klonierung
p447 _{c20Yn0}	p1159	c304 / c260A <i>BssHII</i>
p447 _{c40Yn0}	p1160	c305 / c260A <i>BssHII</i>
p447 _{c60Yn0}	p1161	c306 / c260A <i>BssHII</i>
p447 _{c0Yn63}	p1162	c307 / c259A
p447 _{c0Yn43}	p1163	c308 / c259A
p447 _{c0Yn23}	p1164	c309 / c259A
p447 _{c20Yn23}	p1177	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{c40Yn43}	p1178	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{c60Yn63}	p1179	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{c20Yn43}	p1180	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{c20Yn63}	p1181	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{c40Yn23}	p1182	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{c40Yn43}	p1183	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{c60Yn23}	p1184	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{c60Yn43}	p1185	<i>BspEI</i> / <i>SdaI</i>
p447 _{Yc}	pCR22	R13 / c357
p447 _{cY}	pCR46	R19 / R20

2.2.3.3 Einfügen des 13B6 Epitops und Modifikation der N^{pro}-Spaltstelle

Das Epitop des anti BVDV N^{pro} Antikörpers 13B6 wurde über die Schnittstellen *XhoI* und *HindIII* aus dem Plasmid pJ40 entnommen und in die entsprechenden p842-basierten Plasmide ligiert.

Veränderungen an der Spaltstelle des N^{pro} wurden mittels Verkürzungs-PCRs oder, bei Veränderung einzelner Kodons, mittels Quick Change PCRs auf dem Plasmid p842 oder darauf basierenden Plasmiden generiert. Die Klonierung der N^{pro}-kodierenden Fragmente in den p447 bzw. p1017 (p447 Δ 169-246 N2177Y) erfolgte, nach Kontrolle der Basenabfolge durch Sequenzierung, wiederum durch die Verwendung der *XhoI*- und *Sbf I*-Schnittstellen.

Konstruktbeschreibung	Plasmid	Primer / Klonierung
p1017 ^{13B6+}	pCR3	pJ40 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p1017 ^{+3 N-Term Core AS}	pCR41	R23 / R19
p1017 ^{+3 N-Term Core AS / 13B6+}	pCR51	pJ40 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p1017 ^{+5 N-Term Core AS / 13B6+}	pCR90	R22 / R19 und R32 / R33
p1017 ^{+6 N-Term Core AS}	pCR39	R22 / c216
p1017 ^{+7 N-Term Core AS}	pCR38	R21 / R19
p1017 ^{+7 N-Term Core AS / 13B6+}	pCR50	pJ40 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p1017 ^{+8 N-Term Core AS}	pCR37	R21 / c216
p1017 ^{+10 N-Term Core AS / 13B6+}	pCR27	R14 / c216
p1017 ^{+5 Ala / 13B6+}	pCR85	R25 / R26 und R19 / R31
p1017 ^{+flag / 13B6+}	pCR160	pJ40 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p1017 ^{ΔN2177Y / +5Ala / +13B6}	pCR173	p447 <i>XhoI</i> / <i>SbfI</i>
p447 ^{13B6+}	pJ41	pJ40 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p447 ^{13B6+ Δ170-171}	pCR112	pJ40 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p447 ^{13B6+ Δ170-176}	pCR113	pJ40 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p447 ^{13B6+ Δ170-178}	pCR114	pJ40 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>

2.2.3.4 Modifikationen im N^{pro}

Da es sich bei den Modifikation im N^{pro} um die Veränderung einzelner Kodons handelte, wurden diese über die Anwendung einer Quick-Change-PCR auf dem Plasmid p842 generiert. Nach Sequenzierung zur Kontrolle der Basenabfolge konnten die veränderten Fragmente urch die Verwendung der *XhoI* und *Sbf I* Schnittstellen in das p447 kloniert werden.

Konstruktbeschreibung	Plasmid	Primer / Klonierung
p447 ^{C69A / 13B6+}	pCR188	pCR94 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p447 ^{C69A / N2177Y / 13B6+}	pCR189	pCR94 <i>XhoI</i> / <i>HindIII</i>
p1017 ^{C69A / +3AS}	pCR103	c118 / c119
p1017 ^{C69A / +5AS}	pCR105	c118 / c119
p1017 ^{C69A / +5Ala}	pCR104	c118 / c119
pVp1017 ^{C69A / +10AS}	pCR102	c118 / c119
p447 ^{C112A}	pCR116	c123 / 124

2.2.3.5 Klonierung von viralen Proteinen in pTRE

Das Core- und das GFP-Gen wurden über PCR-Amplifikation mit nachfolgendem Restriktionsenzymverdau in das pTRE kloniert. Verkürzungen des Core-Gens im pTRE wurden mittels PCR generiert.

Proteinname	Plasmid	Primer / Klonierung
Core267 GFP	pCR2	CST132/133, <i>BglII</i> / <i>NotI</i>
GFP	pCR175	c357 / CST75
Core+E ^{ms}	p813	c87 / CST75 <i>AvrII</i> / <i>BamHI</i>
C267	p635	c221 / c220
C255	p679	c217 / c218 blunt / <i>XbaI</i>
C254	p924	E ^{ms} S476Rs / c211
C253	p925	E ^{ms} S476Rs / c212
C252	p943	E ^{ms} S476Rs / c247
C251	p926	E ^{ms} S476Rs / c213
C250	p944	E ^{ms} S476Rs / c248
C249	p945	E ^{ms} S476Rs / c249
C247	p946	E ^{ms} S476Rs / c250
C245	p955	E ^{ms} S476Rs / c255
C243	p956	E ^{ms} S476Rs / c256
C237	p996	E ^{ms} S476Rs / c237

2.2.3.6 Klonierung von RT-PCR-Fragmenten der NS3-Region in den Gesamtklon

Die virale RNS wurde nach Aufreinigung aus der Zelle durch eine RT-PCR mit dem Primer CST8615 rev in cDNS umgeschrieben. Die Amplifikation der cDNS erfolgte mittels PCR mit den Primern CSF8615 rev und CST61. Durch Verdau mit den

Enzymen *EcoRI* und *NgoMIV* konnten die PCR-Fragmente in das p447 kloniert werden.

Konstruktbeschreibung	Plasmid	Primer / Klonierung
p447 _{YC-RTNS3}	pCR250	CST61 / CSF8617rev <i>EcoRI</i> / <i>NgoMIV</i>
p447 _{YC-N2256Y}	pCR282	R118 / R119

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Zellyse

Puffer:	PBS _{defic}		
	1% Chaps:	10mM	Tris HCl pH7,4
		140mM	NaCl
		0,5mM	MgCl ₂
		0,5mM	CaCl ₂
		1%	Chaps (w/v)
	2% SDS:	6M	Harnstoff
		62,5mM	Tris-HCl, pH 6,8
		2%	SDS (w/v)
		10%	Glyzerol (v/v)
		0,025%	Bromphenolblau (w/v)
		0,025%	Phenolrot (w/v)
Gerät:	Tischzentrifuge Pico, Heraeus		

Vor der eigentlichen Lysis wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mehrmals mit PBS_{defic} gewaschen. Danach wurden die Zellen für 20min bei 4°C in 1% Chaps Puffer inkubiert oder direkt in 2% SDS Puffer lysiert. Auf Grund der starken Detergentien im 2% SDS Puffer kam es auch zu einer Lysis der Kerne, wohingegen im 1% Chaps Puffer das Chromatin durch einen Zentrifugationsschritt nach der Lysis (10.000 x g, 1min) entfernt werden konnte.

2.2.4.2 SDS-PAGE

Puffer:	3x Jagow Gel Puffer:	0,3M	Tris-HCl, pH 8,45
		0,3%	SDS
	10x Anodenpuffer:	0,2M	Tris-HCl pH 8,9
	10x Kathodenpuffer:	0,1M	Tris-HCl pH 8,25
		0,1M	Tricin
		1%	SDS (w/v)
	2% SDS Puffer		
Lösungen:	Molekulargewichtsstandard:	prestained	protein marker,
		Invitrogen	
	40% Acrylamid, Applichem		
	TEMED, Fluka		
	10% Ammoniumpersulfat in H ₂ O, Fluka		
	Fisher Gel System 10%, Fisher Scientific		
Gerät:	Proteinelektrophoresekamern, Werkstatt des MZI, JLU Gießen		
	Gelgröße: 6cm x 8cm, Spacer: 0,75mm		

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinproben wurde das SDS-PAGE System mit Tris-Tricin Puffer oder ein kommerziell erhältliches, 10% Gel System (Fisher Scientific) verwendet. Im Tris-Tricin-Gel System wurden je nach Größe der darzustellenden Proteine 7,5 oder 10% Acrylamid in den Gelen eingesetzt (Sammelgel immer 4% Acrylamid). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit gleichem Volumen 2% SDS Puffer versetzt (falls sie nicht schon in diesem Puffer lysiert wurden) und für 5min bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in vertikalen Elektrophoreseapparaturen bei 80V während der Passage durch das Sammelgel und 120V während der Passage durch das Trenngel. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel in der Immunoblotanalyse eingesetzt.

2.2.4.3 Immunoblotanalyse von Proteinen (Western Blot)

Antikörper:	Primärantikörper:	Maus mAk A18, 5H4, 13B6, beta-Aktin
		(Sigma), M2 flag (Sigma), MA143 (Uni Freiburg)

	Sekundärantikörper:	Meerrettich-Peroxidase	gekoppelter
		Ziege anti Maus	
Puffer:	10x Transferpuffer:	480mM	Tris HCl
		390mM	Glycerin in H ₂ O _{Bidest}
		20%	Methanol (v/v)
	Blockierlösung:	4% Milchpulver (Frema) in PBS	0,1% TWEEN 20
	Waschpuffer:	PBS	0,1% TWEEN 20
Material:	Nitrozellulosemembran "pure nitrocellulose", Pall BioMax / BioMax light Film, Kodak		
Gerät:	Nass-Blot-Apparatur, Werkstatt des MZI, JLU Gießen Mini Protean, BioRad horizontaler Schüttler, Edmund Bühler		
Lösungen:	Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN TM), Pierce Ponceau Rot, Roth		

Nach der Auftrennung im SDS-PAGE können Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Für den Transfer wurde eine Nassblotkammer verwendet. Je nach Proteingröße wurde der Transfer bei 67 V oder 77 V für 54min oder bei 12 / 15 V über Nacht, jeweils bei 4 °C, durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation in 4 % Milchpulver in PBS 0,1 % TWEEN 20. Daraufhin wurde nach einem Waschschrift der Erstantikörper in entsprechender Verdünnung zugegeben und für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler oder 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach einem 30-minütigen Waschschrift mit dreimaligem Wechsel des Waschpuffers erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:10.000) bei RT. Nachfolgend wurde für 1h bei RT mit dreimaligem Pufferwechsel gewaschen und der Blot danach entwickelt. Zur Darstellung des Signals wurden BioMax / BioMax ligth Filme (Kodak) bei Belichtungszeiten von 30sec – 20min verwendet.

2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Geräte:	Leica SP5 Konfokalmikroskop
Material:	Glasdeckgläschen (MAGV) Glasobjektträger (Roth)
Lösungen:	PBS _{defic} Kollagen-I in 0,5% Na-Acetat PFA 4% 1% Triton X-100 in PBS def Moviol
Reagenzien:	Ziege anti-Maus Cy3-gekoppelt Ziege anti-Kaninchen Cy3-gekoppelt Ziege anti-Maus Alexa488-gekoppelt Kaninchen anti-PDI polyklonales Serum Maus mAk 13B6 anti BVDV Npro DAPI (300nM in PBS)

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen nach Elektroporation mit der für das zu untersuchende Virus kodierenden RNS in 24-Well Schalen, in denen sich mit Kollagen-I beschichtete Deckgläschen befanden, ausgesät. 24h später erfolgte die Fixierung mit 4% PFA für 20min bei 4°C. Danach wurden die Zellen mit 1% Triton X-100 in PBS_{defic} für 5min permeabilisiert und mit PBS_{defic} gewaschen. Der Erstantikörper wurde mit PBS_{defic} auf die Gebrauchsverdünnung gebracht und jedes Well mit 250µl für 1h bei 37°C inkubiert. Hierauf wurden die Zellen 3x mit PBS_{defic} gewaschen und wiederum für 45min mit dem Zweitantikörper in PBS_{defic} bei 37°C inkubiert. Nachdem die Markierung der Proteine mittels Antikörper abgeschlossen war, wurden die Zellen erneut 3x mit PBS_{defic} gewaschen und für 5min mit DAPI in PBS_{defic} bei RT inkubiert. Nach erneutem 3x Waschen mit PBS_{defic} wurden die Deckgläschen auf einen Movioltropfen auf einem Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 4°C zum Austrocknen des Moviols gelagert. Am nächsten Tag fand dann der mikroskopische Nachweis der Proteine bei entsprechenden Wellenlängen statt.

Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von essentiellen Domänen und Plastizität des Vp447 Core-Proteins

Bisherige Untersuchungen des pestiviralen Core-Proteins bezogen sich auf die Charakterisierung seiner Eigenschaften im Bezug auf RNS-Bindung und RNS-Chaperonaktivität (Ivanyi-Nagy et al., 2008; Murray et al., 2008) sowie auf die Beschreibung seiner Prozessierung (Heimann et al., 2006; Stark et al., 1993). Weiterhin ist bekannt, dass das Core-Protein essentiell für die Virusgenese ist, dazu aber in der Zelle in trans bereitgestellt werden kann (Reimann et al., 2007). Mit den folgenden Versuchen sollten durch gezielte N-terminale, interne und C-terminale Deletionen im Vp447 Core Bereiche des Proteins identifiziert werden, die essentiell für die Bildung von Viruspartikeln sind.

3.1.1 Modifikation des N-Terminus des Vp447 Core-Proteins

Zur Charakterisierung der Toleranz der Viruspartikelbildung auf Verkürzungen des Core-Protein N-Terminus wurden Viren generiert, die eine Verkürzung um zwei, sieben, neun oder elf AS nach dem Serin an AS-Position 169 des Polyproteins aufwiesen (Vp447_{Δ170-171}, Vp447_{Δ170-176}, Vp447_{Δ170-178}, Vp447_{Δ170-180}). Eine Veränderung des Serins wurde auf Grund der Zugehörigkeit zur Spaltstelle des N^{pro} nicht vorgenommen. Verkürzungen von bis zu neun AS wurden am N-Terminus ohne Abfall der Virusproduktion um mehr als das Dreifache des Vp447 24h-Wertes nach Transfektion der entsprechenden viralen Genome in SK6-Zellen toleriert (Abb. 4 und Tab. 1). Jedoch führte die Deletion von zwei zusätzlichen AS (Vp447_{Δ170-180}) zu einem mehr als 40.000-fachen Abfall an Infektiosität im Zellkulturüberstand im Vergleich zum Vp447_{Δ170-178}. Da es sich bei den AS an Position 179 und 180 um Lysine handelt, lag die Vermutung nahe, dass die Funktionalität des Proteins von der Präsenz dieser beiden basischen AS abhängt. Um dies zu überprüfen wurden im Plasmid p447_{Δ170-178} diese zwei Lysine durch Glycin und Serin ersetzt (p447_{Δ170-178SG}). Diese Modifikation führte zu einer leichten Steigerung (achtfach) der viralen

Vermehrung 24h nach Transfektion von genomischer RNS in SK6-Zellen, die Titerreduktion im Vergleich zum Vp447 $_{\Delta 170-178}$ betrug jedoch mehr als das 5.000-fache.

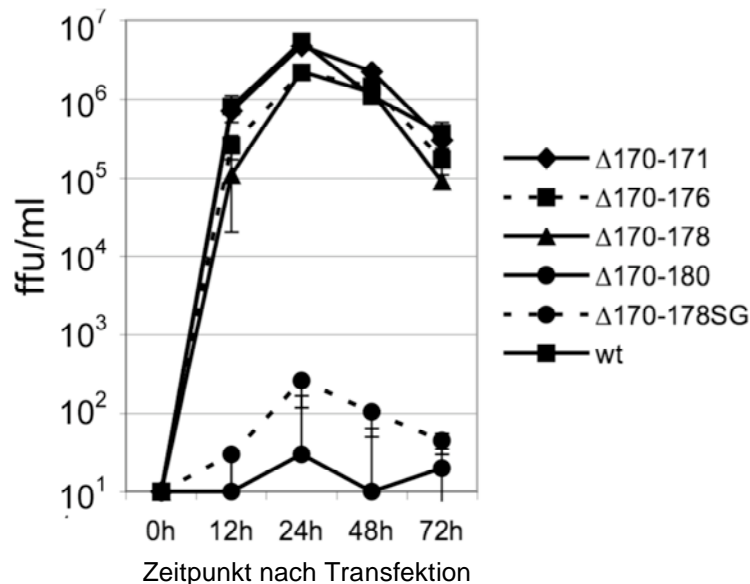


Abb. 4 : Wachstumskurve von Vp447 mit N-terminalen Verkürzungen des Core-Proteins im Vergleich zum Ausgangsvirus. Infektiosität im Überstand (ffu/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion von Transkripten des p447 $_{\Delta 170-171}$, p447 $_{\Delta 170-176}$, p447 $_{\Delta 170-178}$, p447 $_{\Delta 170-180}$, p447 $_{\Delta 170-180SG}$ und p447 in SK6-Zellen (Daten s. Tab. 1). Vp447 $_{\Delta 170-171}$ = $\Delta 170-171$; Vp447 $_{\Delta 170-176}$ = $\Delta 170-176$; Vp447 $_{\Delta 170-178}$ = $\Delta 170-178$; Vp447 $_{\Delta 170-180}$ = $\Delta 170-180$; Vp447 $_{\Delta 170-180SG}$ = $\Delta 170-180SG$; Vp447 = wt. Angegeben sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung aus n=3 unabhängigen Versuchen.

Virus	12h	24h	48h	72h
Vp447 $_{\Delta 170-171}$	710.000	4.750.000	2.250.000	300.000
Vp447 $_{\Delta 170-176}$	255.000	2.200.000	1.450.000	170.000
Vp447 $_{\Delta 170-178}$	110.000	2.250.000	1.200.000	90.000
Vp447 $_{\Delta 170-180}$	10	30	10	20
Vp447 $_{\Delta 170-178SG}$	30	255	105	45
Vp447	800.000	5.300.000	1.100.000	365.000

Tab. 1: Arithmetisches Mittel der Infektiosität im Überstand (ffu/ml) der Viren aus Abb. 4 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen.

3.1.2 Modifikationen in zentralen Bereichen des Vp447 Core-Proteins

Untersuchungen zur Struktur des pestiviralen Core-Proteins ergaben, dass das Protein bis auf die letzten 15 C-terminalen AS intrinsisch ungeordnet ist (Murray et al., 2008; Ivanyi-Nagy et al., 2008). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der *Flaviviridae* sind im Core-Protein der Pestiviren keine vier Alphahelices (Jones, 2003;

Boulant et al., 2005) und auch keine hydrophobe Region in zentralen Bereichen des Proteins in Analogie zum Genus Flavivirus zu finden (Mandl et al., 1988). Da die Core-Funktion der Pestiviren primär auf der positiven Ladung des Proteins beruhen soll, stellte sich die Frage, ob in diesem intrinsisch ungeordneten Protein überhaupt eine Strukturierung und Unterteilung in essentielle und nicht essentielle Bereiche vorhanden ist. Hierzu wurden verschiedene Bereiche des Core-Proteins auf Grund ihrer AS-Sequenz ausgewählt und deletiert (Abb. 5).

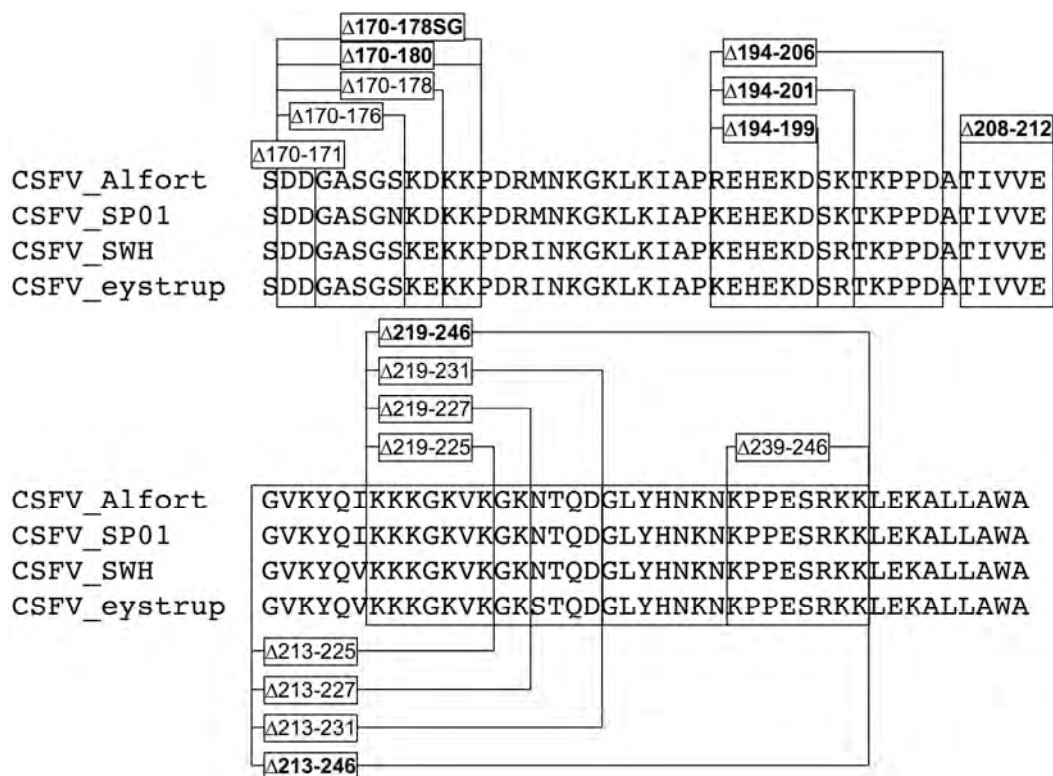


Abb. 5 : ClustalW - Alignment verschiedener KSPV-Isolate sowie Angabe der im p447 deletierten AS ($\Delta X-Y$ als Position im Polyprotein). Fettdruck = Produktion von weniger als 1×10^4 ffu/ml 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen. Gene Bank Zugangsnummern der hier verwendeten Isolate: CSFV_Alfort U90951.1; CSFV_SP01 FJ265020.1; CSFV_SWH DQ127910.1; CSFV_eystrup AF326963.1.

Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in den Auswirkungen verschiedener Deletionen auf die Produktion infektiöser Partikel (Abb. 6 und Tab. 2). Auffällig war die Sensitivität des Virus gegenüber Deletionen in einem kleinen Bereich hydrophober AS ($\Delta 208-212$) sowie in einem Abschnitt mit alternierender Abfolge von sauren und basischen AS ($\Delta 194-198$, $\Delta 194-201$, $\Delta 194-206$). Sie resultierten in einer mehr als 5.000-fachen bzw. 15.000-fachen Reduktion der Infektiosität im Überstand im Vergleich zum Vp447 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen.

Rein basische Regionen konnten hingegen deletiert werden, ohne zu einem mehr als 30-fachen Abfall des Titors zu führen ($\Delta 213-227$). Im Einzelnen zeigte Vp447 $_{\Delta 219-225}$ einen siebenfachen Abfall des Titors, Vp447 $_{\Delta 213-225}$ einen neunfachen, Vp447 $_{\Delta 219-227}$ einen 14-fachen, Vp447 $_{\Delta 219-231}$ einen sechsfachen und Vp447 $_{\Delta 213-231}$ einen 27-fachen Abfall des Titors im Vergleich zu Vp447. Die Deletion von Bereichen direkt vor Beginn des Signalpeptids ($\Delta 239-246$) zeigte mit etwa 15-facher Verminderung des Titors 24h nach Elektroporation im Vergleich zum Vp447 auch geringgradige Auswirkungen auf die Partikelproduktion. Deletionen von AS 213 bzw. 219 – AS 246 wurden hingegen nicht toleriert (weniger als 100 ffu/ml).

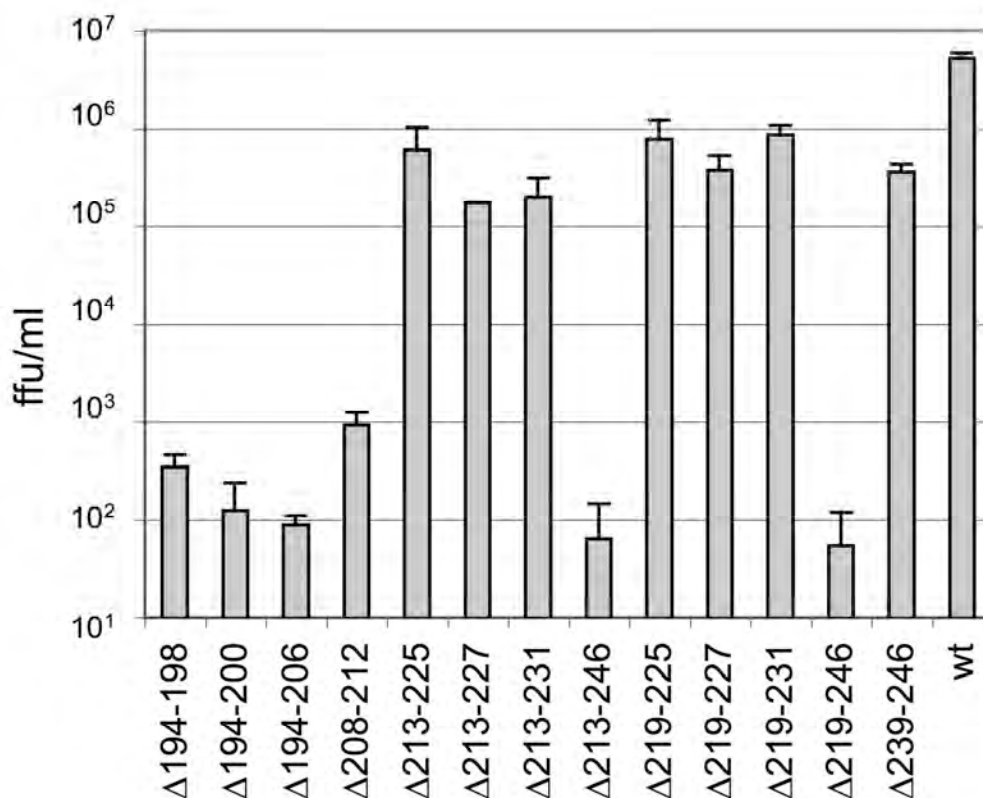


Abb. 6 : Vermehrung verschiedener Vp447 mit internen Deletionen im Core-Protein 24h nach Elektroporation des entsprechenden viralen Genoms in SK6-Zellen (ffu/ml). Deletierte AS werden unter den Balken als $\Delta X-Y$ (AS-Position im Polyprotein) angegeben. wt = Vp447. Angegeben sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung aus n=3 unabhängigen Versuchen.

Virus	Virustiter (ffu/ml)
Δ194-198	343
Δ194-200	123
Δ194-205	87
Δ208-212	930
Δ213-225	607.000
Δ213-227	173.000
Δ213-231	200.000
Δ213-246	63
Δ219-225	773.000
Δ219-227	377.000
Δ219-231	857.000
Δ219-246	53
Δ239-246	360.000
wt	5.300.000

Tab. 2: Datentabelle zu Abbildung 6. Arithmetisches Mittel aus n=3 unabhängigen Versuchen.

3.1.3 Modifikationen im C-terminalen Bereich des Vp447 Core-Proteins

Die Untersuchung von Verkürzungen des Core-Proteins im C-terminalen Bereich erfolgte durch zelluläre Transkomplementierung verschiedener, am C-Terminus verkürzter Core-Proteine, wobei die Funktionalität dieser verkürzten Core-Proteine anhand der Virusbildung einer AS169-246 Deletionsmutante des Vp447 (Vp619) nachgewiesen wurde. Dieses Virus ist nur in der Lage, Partikel zu bilden, wenn eine Transkomplementierung von Core erfolgt (in Analogie zu den Experimenten von Reimann et al. (2007) mit BVDV). Eine Verkürzung des C-terminalen Bereichs im Gesamtklon ist auf Grund der Präsenz von Teilen des Signalpeptids nicht durchführbar, da die Bestimmung der viralen Vermehrung keine Unterscheidung zwischen Funktionsverlust des Core-Proteins und des Signalpeptids ermöglichen würde. Daher wurden SK6 tet on Zelllinien generiert, die Core und E^{rns}, Core (C) bis AS 267 (Spaltstelle der SP am E^{rns} N-Terminus), 255 (Spaltstelle der SPP am C-Terminus des Core-Proteins = matures Core), 254, 253, 252, 251, 250, 249, 247, 245, 243 oder 237 induzierbar exprimieren (Position der AS im Polyprotein). Es zeigte sich, dass die Expression des Core - E^{rns} - Vorläuferproteins mit $1,8 \times 10^5$ ffu/ml die Produktion von infektiösen Partikeln am effektivsten unterstützte. Ein Viertel dieser Infektiosität konnte bei Transkomplementierung von C267 und C255 im Überstand nachgewiesen werden. Die Expression von C254 führte zu einem knapp 30-fachen Abfall der infektiösen Partikel im Überstand im Vergleich zu C255. Weitere

Deletionen am C-Terminus führten zu Titern zwischen 200 und 500 ffu/ml Überstand, jedoch kam es bei der Bereitstellung von C247 oder C245 wieder zu einem Titeranstieg um das etwa Zehnfache ($3,4 \times 10^3$ ffu/ml bzw. $6,2 \times 10^3$). Bei Expression von C237 konnte keine Infektiosität im Überstand detektiert werden.

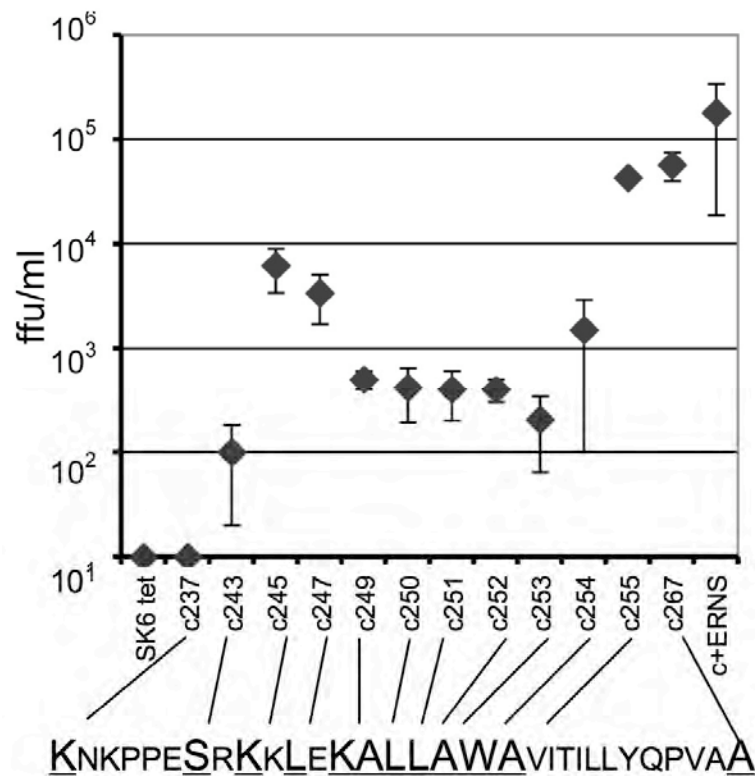


Abb. 7 : Untersuchung zum Einfluss C-terminaler Verkürzungen des Core-Proteins auf die Virusbildung. Zur Überprüfung des Einflusses von C-terminalen Deletionen des Core-Proteins auf die Virusproduktion wurden SK6 tet on Zellen, die induzierbar C237, C243, C245, C247, C249, C250, C251, C252, C253, C254, C255, C267 und Core+E^{ms} exprimieren, mit genomischer RNS des Vp619 transfiziert. 24h nach Transfektion wurde die Infektiosität im Überstand in ffu/ml bestimmt. Als Negativkontrolle diente die SK6 tet on Ausgangszelllinie. Dargestellt sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung aus n=3 unabhängigen Versuchen.

3.1.4 Duplikation und Triplikation des Vp447 Core-Gens

Für Pestiviren wurde eine ikosaedrale Symmetrie des Nukleokapsids, bestehend aus Core-Protein und viralem Genom, postuliert. Neuere Untersuchungen stellen diese Annahme jedoch in Frage und favorisieren ein Modell, bei dem das Core-Protein eine Histon-artige Interaktion mit dem viralen Genom eingeht (Murray et al., 2008). Falls Pestiviren ein ikosaedrales Nukleokapsid besitzen, sollte eine Größenveränderung des Core-Proteins die Viruspartikelbildung negativ beeinflussen. Um die Toleranz des Vp447 auf Vergrößerung der Nukleokapsid-bildenden Einheiten

zu untersuchen, wurden Viren generiert, die für Duplikate (Vp447_{CC}) und Triplikate (Vp447_{CCC}) des Core-Proteins kodieren. Diese Viren zeigten keine Einschränkungen in der Replikation und konnten infektiöse Partikel bilden. Dabei war die Virusmenge im Überstand für das Vp447_{CC} um das Vierfache, für das Vp447_{CCC} um das 25-fache im Vergleich zum Vp447 vermindert (24h nach Transfektion der genomischen RNS in SK6-Zellen) (Abb. 8 und Tab. 3). Der Verlauf der Wachstumskurven des Vp447_{CC} und Vp447_{CCC} war mit derjenigen des Vp447 vergleichbar. Beide vergrößerten Core-Proteine waren in der Western Blot Analyse in angereicherten Viruspartikeln nachweisbar. Die Integration des triplizierten Core-Proteins erschien im Vergleich zum Coreduplikat deutlich vermindert (Abb. 9).

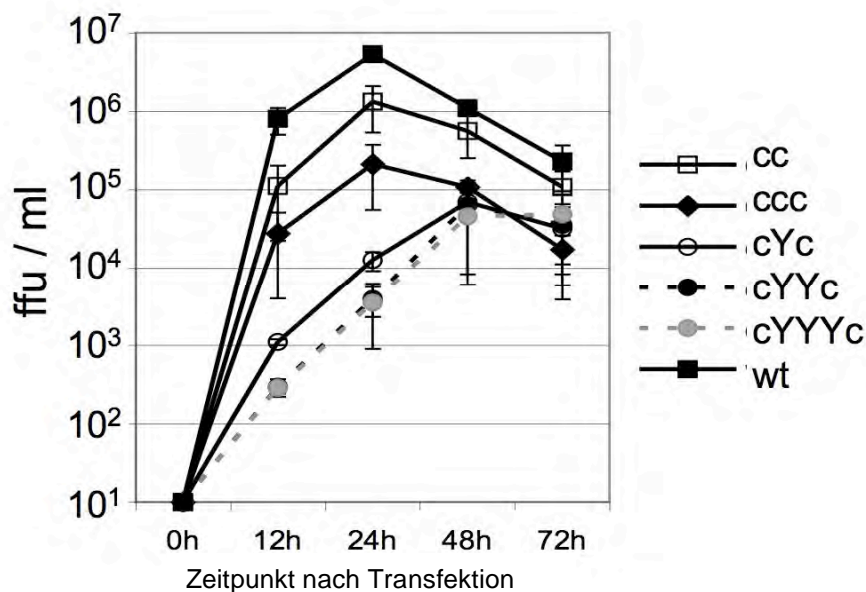


Abb. 8 : Wachstumskurven des Vp447_{CC}, Vp447_{CCC}, Vp447_{cYc}, Vp447_{cYYc} und Vp447_{cYYYc} im Vergleich zu Vp447 nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6 Zellen. Virustiter (ffu/ml) wurden 12, 24, 48 und 72h nach Transfektion bestimmt. cc = Vp447_{CC}; ccc = Vp447_{CCC}; cYc = Vp447_{cYc}; cYYc = Vp447_{cYYc}; cYYYc = Vp447_{cYYYc}. Dargestellt sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung aus n=3 unabhängigen Versuchen.

Virus	12h	24h	48h	72h
wt	800.000	5.300.000	1.100.000	230.000
Vp447 _{CC}	111.000	1.315.000	555.000	108.000
Vp447 _{CCC}	27.500	212.500	108.000	17.100
Vp447 _{cYc}	1.100	12.500	69.100	31.450
Vp447 _{cYYc}	295	3.950	63.000	35.450
Vp447 _{cYYYc}	285	3.550	45.500	48.500

Tab. 3 : Datentabelle zu Abb. 8. Arithmetisches Mittel aus n=3 unabhängigen Versuchen. Angaben der Titer in ffu/ml.

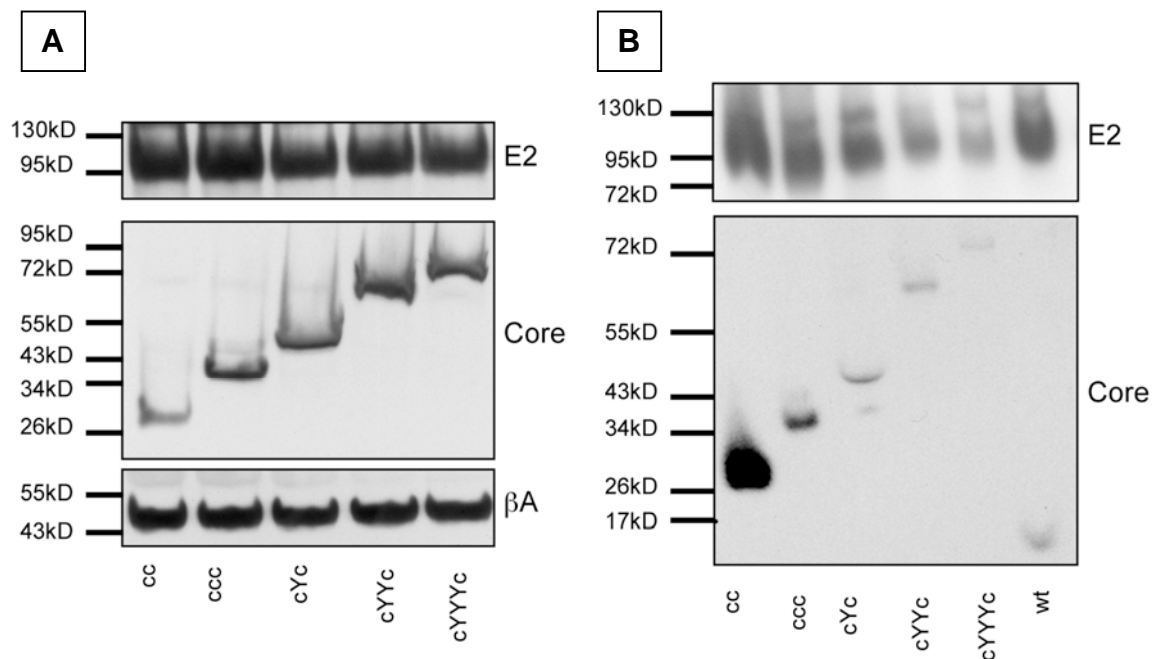


Abb. 9 : Nachweis der Core-Proteine der Viren aus Abb. 8 in (A) Zelllysate und (B) angereicherten Partikeln in der Western Blot Analyse. Zusätzlich wurden virales E2 (E1E2 Heterodimer ca. 95kD) und als Ladungskontrolle des Zelllysats β-Aktin detektiert. Die Lysis der Zellen erfolgte 72h nach Transfektion der entsprechenden viralen Genome in SK6-Zellen. Eine Anreicherung der Partikel aus dem Überstand erfolgte 72h nach Transfektion mittels Ultrazentrifugation. Zum Nachweis des Core-Proteins diente der mAk 5H4, des E2 der mAk A18. β-Aktin wurde mittels einem anti-βAktin mAk detektiert. Zur Auftrennung der Proteine wurden 10% Polyacrylamid-Gele verwendet.

3.1.5 Vp447_{cc} mit ein bis drei YFP-Genen zwischen den beiden Core-Genen

Da die Duplikation des Core-Gens durch das Virus nur mit geringen Veränderungen im Wachstum einherging, stellte sich die Frage, ob eine weitere Vergrößerung des Core-Proteins durch Integration nichtviraler Proteine noch zur Bildung infektiöser Partikel führen würde. Zusätzlich war von Interesse, ob diese Konstrukte auch zur Expression von Fremdgenen, mit nachfolgender Integration in das Viruspartikel, verwendet werden könnten. Hierzu wurden ein bis drei YFP-Gene zwischen die beiden Core-kodierenden Regionen des p447_{cc} gesetzt (p447_{cYc}, p447_{cYYc}, p447_{cYYYc}). Es zeigte sich, dass es durch die Integration von YFP-Genen zu einer Verlangsamung der Vermehrungsgeschwindigkeit, abhängig von der Anzahl an integrierten YFP-Genen, kam. 48h nach Elektroporation der entsprechenden RNS in SK6-Zellen wurde von allen YFP-kodierenden Viren ein Titer von $4.5-6.9 \times 10^4$ ffu/ml erreicht, was einer etwa 20-fachen Reduktion gegenüber dem 48h Wert des Vp447

entspricht (Abb. 8 und Tab. 3). Die rekombinanten Core-Proteine waren sowohl in der Western Blot Analyse als auch in der Immunfluoreszenz in infizierten Zellen nachweisbar. Auch im Viruspartikel konnten die vergrößerten Core-Proteine detektiert werden (Abb. 9).

Die Stabilität der Viren wurde durch wiederholte Passagierung überprüft. Nach drei bis vier Passagen zeigte sich für das Vp447_{CC}, Vp447_{CCC} und Vp447_{cYc} ein Core-Proteinsignal in der Western Blot Analyse, das eine dem Vp447 Core vergleichbare Größe aufwies (für Vp447_{CC} und Vp447_{cYc} in Abb. 11 dargestellt). Sequenzanalysen der passagierten Viren ergaben eine exakte Wiederherstellung der ursprünglichen Vp447 Core-Sequenz. Um die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination zu verkleinern wurde ein Plasmid generiert, in dem das N-terminale Core-Gen des p447_{cYc} durch die entsprechende BVDV-Sequenz ersetzt wurde (p447_{BVDVcYc}). Hierbei war nach 3 Passagen des entsprechenden Virus auch eine 16kD Bande in der Core Western Blot Analyse nachweisbar (Abb. 11). Die Sequenzanalyse des passagierten Virus zeigte, dass es zu einem Verlust von sechs N-terminalen AS des Vp447 Core-Proteins (AS172-177) und zum kompletten Verlust des NCP-7 Core-Gens gekommen war. Dieser Verlust N-terminaler AS hat, wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, jedoch kaum Auswirkungen auf die Vermehrung des Virus.

Um zu überprüfen, ob das Core-Protein auch bei räumlicher Trennung von einzelnen Teilen funktionell bleibt, wurden Modifikationen des p447_{cYc} erstellt. Diese wiesen entweder C-terminale Verkürzungen des N-terminalen Core-Proteins (20, 40 oder 60 AS), N-terminale Verkürzungen des C-terminalen Core-Proteins (23, 42 oder 63 AS), oder Kombinationen aus den Vorgenannten auf. Die einzelnen, nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen geretteten Viren sind zusammen mit ihren Wachstumseigenschaften in Abb. 10 dargestellt.

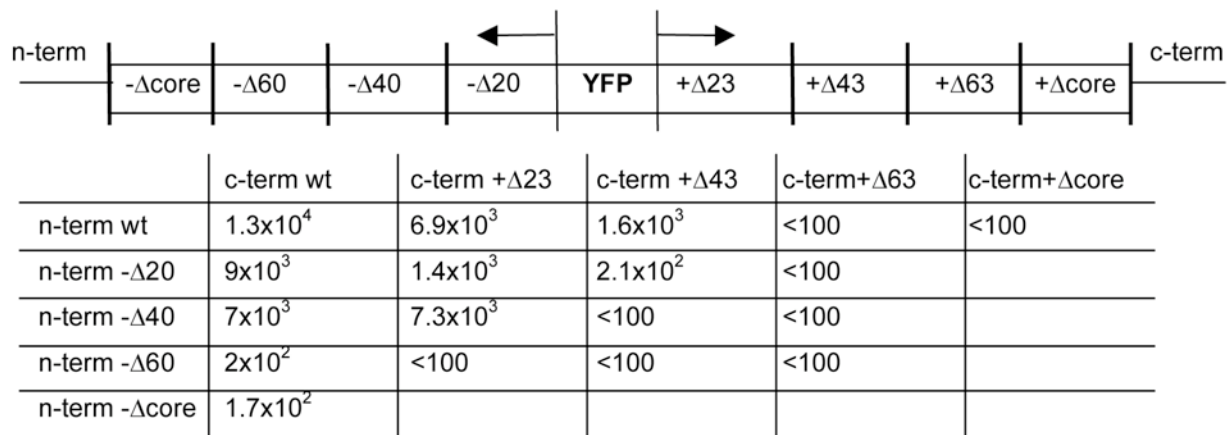


Abb. 10 : Infektiosität im Überstand verschiedener Vp447_{cYC} Deletionsmutanten 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen (ffu/ml; Nachweisgrenze 100 ffu/ml). Verkürzt wurde jeweils vom C-Terminus des N-terminalen Core-Gens (-ΔXY) und vom N-Terminus des C-terminalen Core-Gens (+ΔXY).

Zunächst fiel auf, dass die komplette Deletion eines der beiden Core-Proteine im Falle des N-terminalen Core-Proteins zu einer sehr starken Suppression des Wachstums führte (Vp447_{YC}), im Falle des C-terminalen Core-Proteins nahezu zur Unfähigkeit, infektiöse Partikel zu bilden (Vp447_{cY}). Die Verkürzung eines der beiden Core-Proteine um 20, 40 oder 60 AS bzw. 23, 43 oder 63 AS führte zu Viren, die Titer zwischen 9×10^3 und 2×10^2 ffu/ml erreichten, wobei die Titer mit Vergrößerung der Deletion abnahmen und Verkürzungen des C-terminalen Core-Proteins stärkere Auswirkungen auf die virale Vermehrungsfähigkeit hatten. Bei Kombination von Deletionen des N- und C-terminalen Core-Proteins konnte Virus im Überstand nachgewiesen werden, wenn die Deletionen insgesamt nicht mehr als 63 AS umfassten (Nachweisgrenze 100 ffu/ml). Die Titer bewegten sich zwischen $2,1 \times 10^2$ und $7,3 \times 10^3$ ffu/ml 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen. Bei Kombination größerer Deletionen konnte keine Infektiosität im Überstand nachgewiesen werden.

Um die genetische Stabilität dieser Viren zu testen wurden das Vp447_{c-20Yn+23} und das Vp447_{YC} auf SK6-Zellen passagiert. Das Vp447_{c-20Yn+23} zeigte schon nach der ersten Passage einen Titeranstieg um das 1000-fache (Abb. 12). Diese Veränderung konnte durch Western Blot Analyse und Sequenzierung der Core-kodierenden Region auf die Wiederherstellung der ursprünglichen Vp447 Core-Sequenz zurückgeführt werden. Auch das Vp447_{YC} zeigte nach der zweiten Passage einen Anstieg des Titers um das 100-fache (Abb. 12). Dies legte eine genetische Veränderung des Virus nahe, jedoch war diese nicht in der Core- bzw YFP-

kodierenden Region des Virus zu finden, da in Western Blot und Sequenzanalyse nur das YFP-Core nachgewiesen werden konnte.

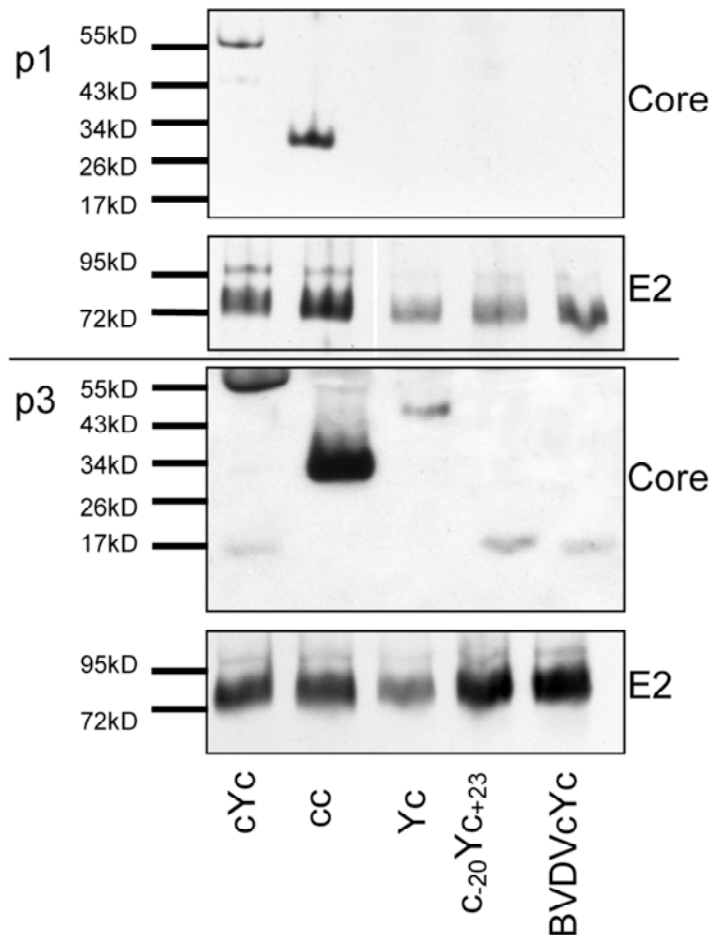


Abb. 11 : Detektion des Core- und E2-Proteins in angereicherten Viruspartikeln des Vp447_{cYc}, Vp447_{CC}, Vp447_{Yc}, Vp447_{n20Yc+23} und Vp447_{BVDVcYc} nach der ersten und dritten Passage auf SK6-Zellen mittels Western Blot Analyse. Der Nachweis des Core-Proteins und des E2-Proteins (Heterodimer) wurde mit dem mAb 5H4 bzw. mAb A18 durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 10% Polyacrylamidgelen. cc = Vp447_{CC}; cYc = Vp447_{cYc}; Yc = Vp447_{Yc}; n-20Yc+23 = Vp447_{n-20Yc+23}; BVDVcYc = Vp447_{BVDVcYc}; p1 = Passage 1; p3 = Passage 3.

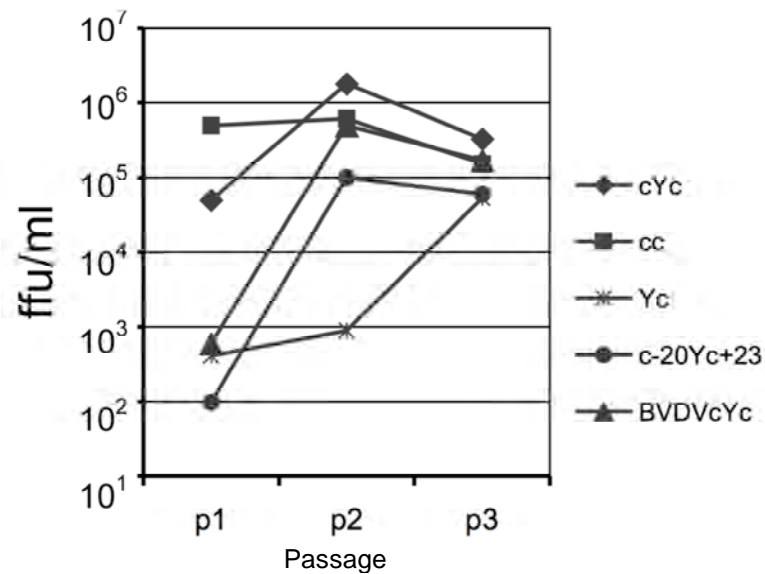


Abb. 12 : Infektiosität im Überstand der mit den Viren aus Abb. 12 infizierten SK6-Zellen zum Zeitpunkt der ersten (p1), zweiten (p2) und dritten (p3) Passage (ffu/ml). Abkürzungen s. Abb. 12.

Bei der Analyse weiterer Sequenzen des passagierten Vp447_{Yc}, mit dem Ziel die ursächliche genetische Veränderung für das verbesserte Wachstum zu identifizieren, zeigten sich mehrere AS-Austausche in der NS3-kodierenden Region. Wurde das mittels reverser Transkription gewonnene NS3-Fragment des Vp447_{Yc} Passage 3 über *EcoRI NgoMVI* in das originäre p447_{Yc} eingesetzt, so steigerte sich die virale Vermehrung nach Transfektion des entsprechenden Transkripts um mehr als das 100-fache (Vp447_{Yc-RT NS3}) (Abb. 13). Weitere Analyse der beteiligten Mutationen ergab, dass der Austausch der AS 2256 von Asparagin nach Tyrosin ausreichend war, um diese Veränderung der Wachstumseigenschaften zu bewirken (Vp447_{Yc-N2256Y}) (Abb. 13). Die Integration des Yc-Moleküls in die Viruspartikel war für Vp447_{Yc} mit AS-Austausch N2256Y oder mit NS3-RT-Fragment des durch Passage revertierten Virus vergleichbar (Abb. 14).

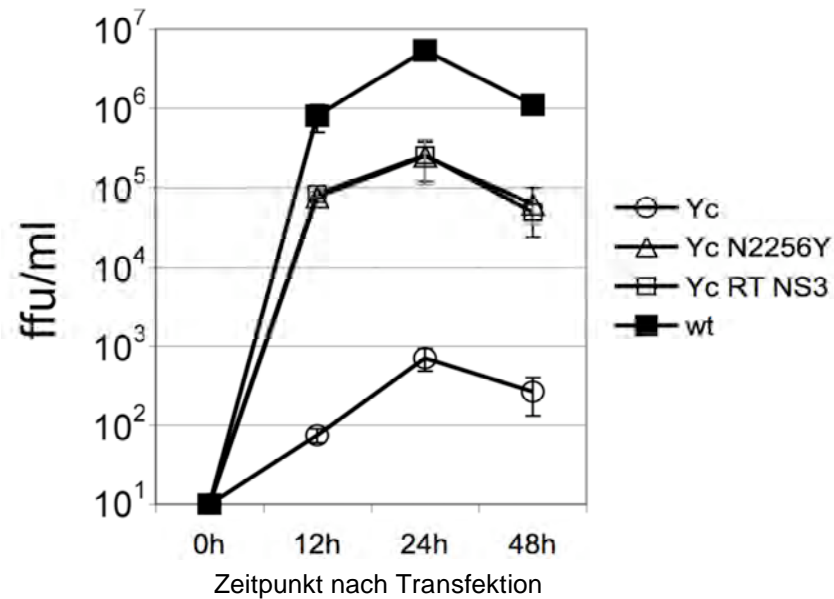


Abb. 13 : Wachstumskurve des Vp447, Vp447_{Yc}, Vp447_{Yc-RT NS3} und Vp447_{Yc-N2256Y} nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen (ffu/ml). wt = Vp447; Yc = Vp447_{Yc}; Yc N2256Y = Vp447_{Yc-N2256Y}; Yc RT NS3 = Vp447_{Yc-RT NS3}. Dargestellt sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung aus n=3 unabhängigen Versuchen.

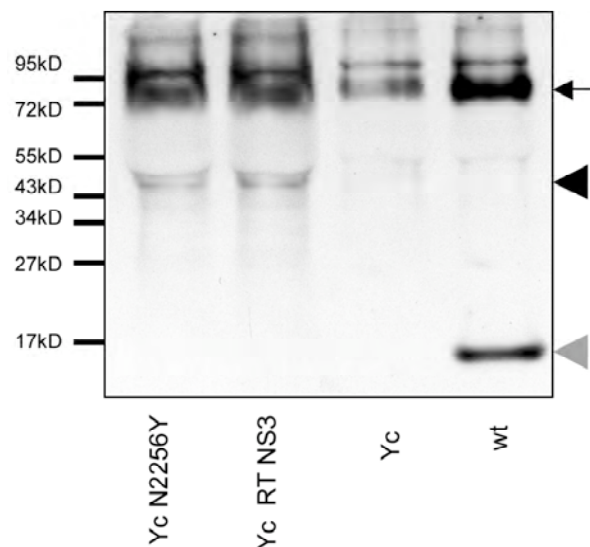


Abb. 14 : Nachweis des E2- und Core-Proteins in angereicherten Viruspartikeln des Vp447, Vp447_{Yc}, Vp447_{Yc-RTNS3} und Vp447_{Yc-N2256Y} 48h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10% Polyacrylamid-Gel. Abkürzungen s. Abb. 13. Der schwarze Pfeil markiert das E1E2-Heterodimer, die schwarze Pfeilspitze das YFP-Core-Protein und die graue Pfeilspitze das Core-Protein.

3.2 Charakterisierung eines Vp447 mit fast vollständiger Deletion der Core-kodierenden Region (AS 170-246)

Entgegen der Lehrmeinung konnte gezeigt werden, dass das Core-Protein des Vp447 (KSPV Alfort Tübingen) in vitro nicht für die Bildung infektiöser Viruspartikel benötigt wird (Rümenapf, personal communication). Die Rolle des Core-Proteins in der Virusgenese kann durch einen Aminosäureaustausch in der NS3-Helikase-Domäne kompensiert werden (in den im Folgenden verwendeten Viren N2177Y, Vp447 mit AS Deletion 170-246 = Vp1017), und somit die Abgabe von Viren aus der Zelle ermöglichen. Daraus ergibt sich die Frage nach von der Partikelgenese unabhängigen Funktionen des KSPV Core-Proteins, da der virale Lebenszyklus offensichtlich in vitro auch ohne das Core-Protein vollzogen werden kann. In vivo Versuche zeigten, dass das Vp1017 für Schweine - im Gegensatz zum virulenten Vp447 - avirulent ist und keine nachweisbare Virämie auftritt.

Zielsetzung der nachfolgenden Versuche war die Identifikation von Eigenschaften des Vp1017, die für den Virulenzverlust in vivo verantwortlich sein könnten. Dies sollte letztendlich zur Bestimmung von Core-Funktionen ausserhalb des Bereichs der Partikelmorphogenese führen.

3.2.1 Wachstum des Vp1017 auf primären Schweinezellen

Das Vp1017 erzielte bei Vermehrung in SK6-Zellen etwa 20-fach schlechtere Titer als das Vp447. In vivo war die Vermehrungsfähigkeit des Vp1017 im Vergleich zum Vp447 deutlich stärker eingeschränkt. Es sollte daher eine Untersuchung des Verhaltens des Vp1017 auf primären porzinen Zellen erfolgen. Hierzu wurden Endothel-Zellen aus Schweineaorten (ppE) durch Abschaben und periphere Blutmonozyten (ppM) mittels Gradientenzentrifugation aus Schweineblut gewonnen (s. Kap. 2.2.1.10 und 2.2.1.11). Die Monozyten wurden nach der Isolation für 7 Tage in Teflonbeuteln inkubiert, wodurch eine Differenzierung zu Promakrophagen angestrebt wurde (Andreesen et al., 1983). Um das virale Wachstum zu bestimmen wurden 1×10^5 Zellen / Well auf 24-Well-Platten ausgesät und mit einer MOI (multiplicity of infection) von 1 mit Vp447 oder Vp1017 in 500µl Volumen infiziert. 4h

nach der Infektion wurde das Medium gewechselt. Überstand wurde nach 24h und 48h gewonnen und die Virustiter (ffu/ml Medium) auf SK6-Zellen bestimmt. Zur Kontrolle der Infektion wurden die primären Zellen 48h nach Infektion mit Methanol-Azeton fixiert und das virale E2-Antigen immunhistochemisch nachgewiesen. Hierbei fiel auf, dass nur vereinzelt E2-positive Zellen nachgewiesen werden konnten, wenn die Zellen mit Vp1017 infiziert worden waren. Hingegen waren in mit Vp447 beschickten Wells mehr als 50% der Zellen Antigen-positiv.

Das Vp1017 zeigte auf primären porcinen Endothelzellen (ppE) eine deutlich verminderte Virusproduktion (Abb. 15 und Tab. 4). 24h nach Infektion war der Titer im Vergleich zum Vp447 mehr als 300-fach, nach 48h mehr als 5000-fach reduziert. Gleichermäßen war auf primären porcinen Makrophagen (ppM) nach 24h eine mehr als 200-fache, nach 48h eine mehr als 2000-fache Titerreduktion im Vergleich zum Vp447 zu beobachten (Abb. 15 und Tab. 4). Da Makrophagen auch als primäre Zielzellen des KSPV angesehen werden und Pestiviren dafür bekannt sind, eine persistierende Infektion in ihren Wirten auslösen zu können, wurde für diese Zellen auch der Titer 7d (168h) nach Infektion bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt produzierte das Vp1017 mehr als 15.000-fach weniger infektiöse Partikel als das Vp447. Dabei war der Titer für das Vp1017 in 2 von 3 Versuchen unterhalb der Nachweisgrenze (10 ffu/ml). Auffällig war auch der Verlauf der Titer, da das Vp1017 schon 48h nach Infektion einen Abfall des Titers aufwies, während das Vp447 zu diesem Zeitpunkt das Maximum des Titers erreichte.

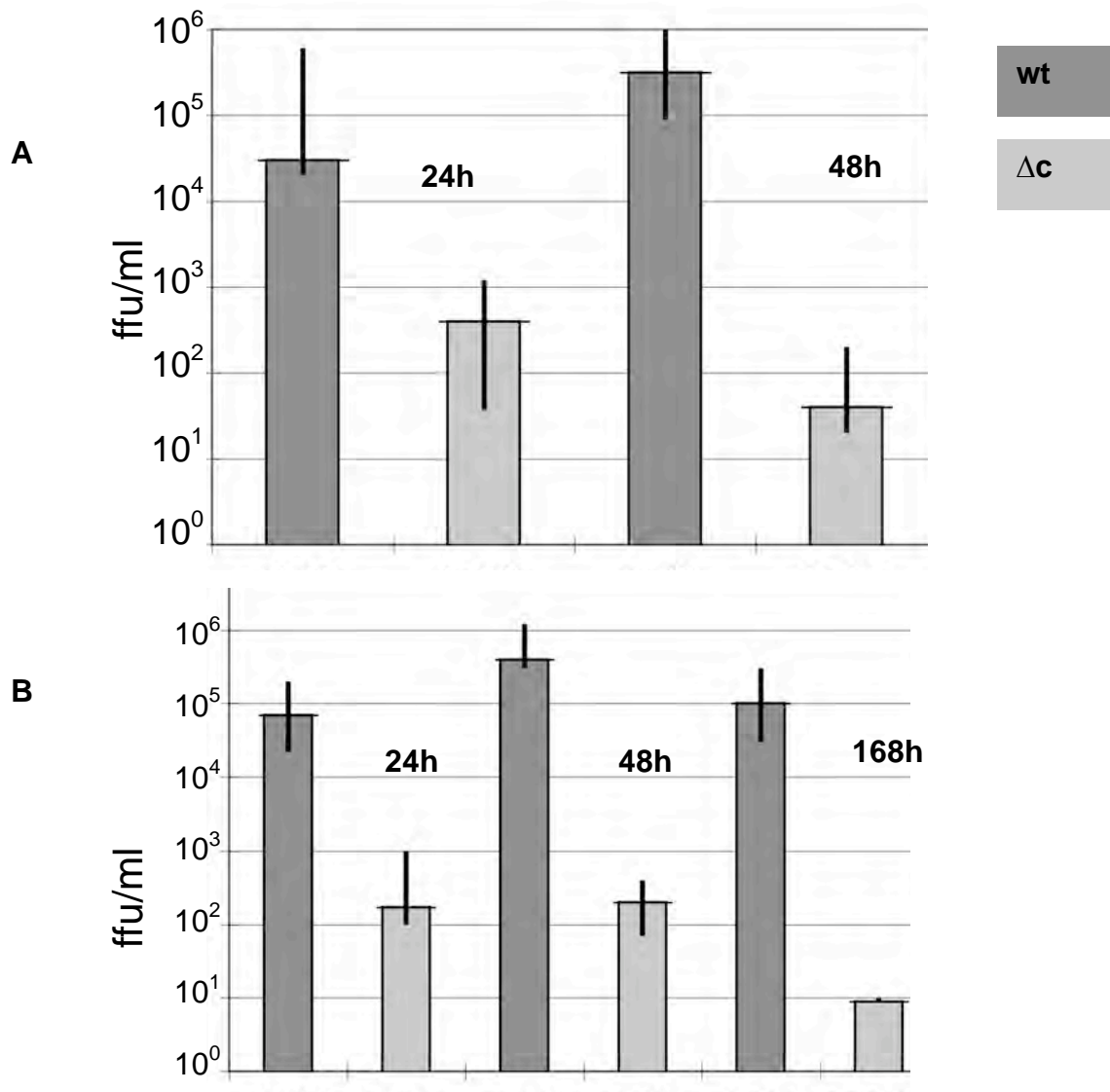


Abb. 15 : Vermehrung des Vp447 und Vp1017 (ffu/ml) nach Infektion von ppE (A) und ppM (B) (MOI 1 für 4h). Dargestellt sind jeweils Median, Maximum und Minimum (ppE n=6; ppM n=3) zum Zeitpunkt 24h und 48h nach Infektion, für ppM auch 168h nach Infektion. wt = Vp447; Δc = Vp1017.

	24h	48h	168h
ppE Vp447	146.667	423.833	
ppE Vp1017	458	81	
ppM Vp447	97.333	633.333	143.333
ppM Vp1017	423	223	<10

Tab. 4 : Arithmetisches Mittel der Titer von Vp447 und Vp1017 24h und 48h nach Infektion von ppE und ppM mit einer MOI von 1. Für ppM wurde zusätzlich noch der 168h-Wert bestimmt. Verwendet wurden Daten aus sechs (ppE) bzw. drei (ppM) unabhängigen Versuchen.

Da in den vorangegangenen Versuchen auffallend wenige Primärzellen durch das Vp1017 infiziert werden konnten, wurde im folgenden Versuch die Empfänglichkeit der ppE für das Vp447 und das Vp1017 im Vergleich zu SK6-Zellen getestet (s. Kap. 2.2.1.8). Mit der Empfänglichkeit wird die Eigenschaft einer Zelle beschrieben, die Vermehrung eines Virus zu unterstützen. In 8 Versuchsansätzen ergab sich für das

Vp447 eine durchschnittliche Empfänglichkeit der ppE von 1,3%, für das Vp1017 eine durchschnittliche Empfänglichkeit von 0,03% im Vergleich zu SK6-Zellen (Abb. 16). Daraus resultiert eine mehr als 40-fache Reduktion der Empfänglichkeit der ppE für das Vp1017 im Vergleich zum Vp447. Jedoch war die Empfänglichkeit der ppE für das Vp447 auch deutlich vermindert.

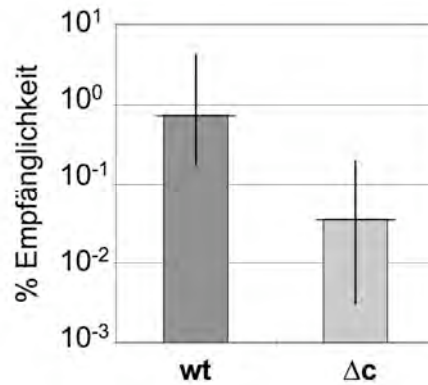


Abb. 16 : Empfänglichkeit von ppE für das Vp447 und das Vp1017 im prozentualen Vergleich zu SK6-Zellen (Anzahl infizierter Zellen auf SK6-Zellen entspricht 100%). Dargestellt sind Median, Maximum und Minimum aus 3 unabhängigen Versuchen mit je 2 - 4 ppE-Präparationen (n=8). wt = Vp447; Δc = Vp1017.

In der Literatur existieren verschiedene Hinweise, dass ein aktiviertes IFN-System die Empfänglichkeit der Zellen für Pestiviren merklich herabsetzt (Knoetig et al., 2002; Schweizer et al. 2006). Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung des IFN-Systems der ppE für den Empfänglichkeitsverlust verantwortlich sein könnte, wurde in der Western Blot Analyse die Expression von MxA, einem streng IFN-regulierten Genprodukt (Haller et al., 1980), untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ppE das MxA bereits vor der Infektion exprimierten (Abb. 17). Bei der Kontrolle der viralen Proteinexpression von mit Vp1017 infizierten ppE war es im Gegensatz zum Vp447 nicht möglich, virales E2 in der Western Blot Analyse nachzuweisen. Die starke Inhibition des Vp1017 auf primären Zellen, zusammen mit dem Nachweis eines aktivierten IFN-Systems in ppE, führte zur Hypothese, dass das Vp1017 eine verstärkte Sensitivität gegenüber einem aktivierten IFN-System der Wirtszellen aufweist.

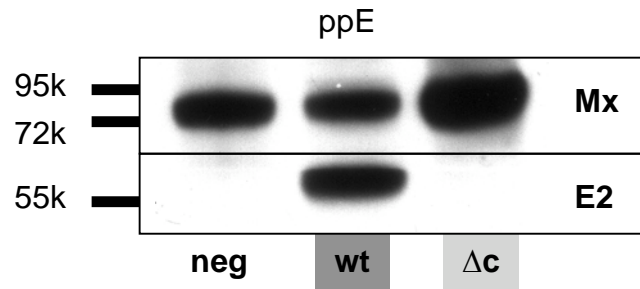


Abb. 17 : Nachweis von MxA und viralem E2 (Monomer, etwa 55kD) in Lysaten von ppE 48h nach Infektion mit Vp447 oder Vp1017, MOI 1. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 7,5% Polyacrylamid-Gel. Um eine Inkubation der Membran mit mAbs gegen MxA und E2 zu ermöglichen wurde diese durchtrennt (durch horizontalen Strich gekennzeichnet). wt = Vp447; Δc = Vp1017.

3.2.2 Wachstum des Vp1017 auf verschiedenen Schweinezelllinien

Zur Überprüfung der in Kapitel 3.2.1 aufgestellten Vermutung sollte nun das Verhalten des Vp1017 auf verschiedenen Schweinezelllinien, mit oder ohne Gabe von IFN α , getestet werden. Hierzu standen 3 porcine Zelllinien, SK6, STE und PK15, zur Verfügung. Bei SK6-Zellen handelt es sich um eine Schweinenierenzelle, die sich durch eine hohe Empfänglichkeit für das Vp1017 auszeichnet. Interessanterweise reagieren SK6-Zellen weder bei Stimulation mit Polyinosin-Polycytidyl-Säure (pIC, ein synthetisches Imitat viraler dsRNS), noch bei Infektion mit N^{pro}-Deletionsmutanten des KSPV (ΔN^{pro} KSPV) mit einer Aktivierung des IFN-Systems (Ruggli et al., 2003). Somit kann diese Zelllinie als Negativkontrolle für eine Aktivierung des IFN-Systems durch dsRNS oder eine pestivirale Infektion verwendet werden. Bei PK15-Zellen handelt es sich um Nierenendothelzellen, wohingegen STE-Zellen aus Schweinehoden gewonnen wurden.

Um das Wachstum des Vp1017 in diesen Zelllinien im Vergleich zum Vp447 zu untersuchen, wurden je 1×10^5 Zellen / Well auf 24-Well-Platten ausgesät und mit einer MOI von 1 infiziert. Nach 4h wurde das Medium gewechselt und ein Teil der Zellen mit 300iU/ml IFN α behandelt. Überstand wurde 24h und 48h nach der Infektion gewonnen und die Anzahl der infektiösen Partikel in ffu/ml bestimmt (Abb. 18 und Tab. 5).

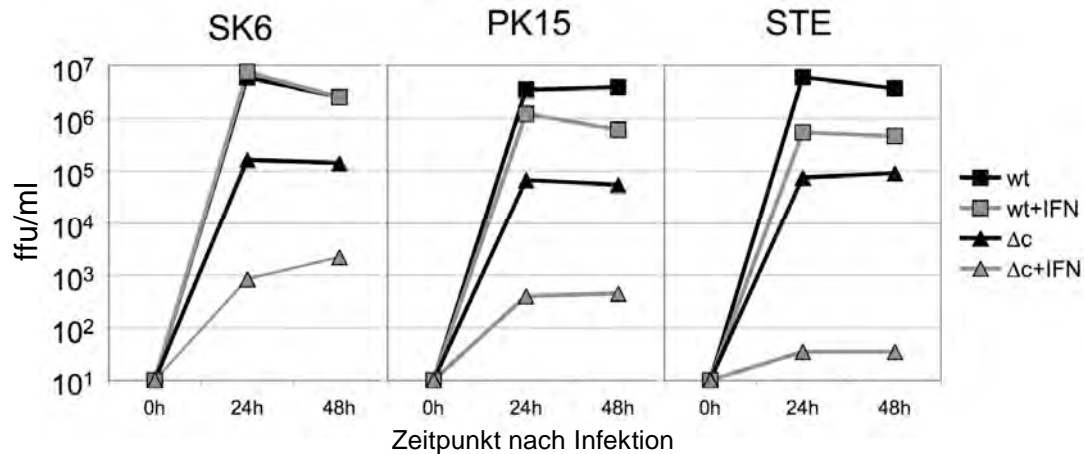


Abb. 18 : Vergleichende Virusfreisetzung aus PK15-, SK6- und STE-Zellen 24h und 48h nach Infektion mit Vp447 oder Vp1017 (MOI 1) mit und ohne IFN-Gabe 4h nach Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen. wt = Vp447; Δc = Vp1017.

24h	SK6	+IFN	/	PK15	+IFN	/	STE	+IFN	/
Vp447	$5,9 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	0,8	$3,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	2,9	6×10^6	$5,4 \times 10^5$	11
Vp1017	$1,6 \times 10^5$	$8,5 \times 10^2$	188	$6,7 \times 10^4$	$4,1 \times 10^2$	163	$7,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^1$	2143
/	37	8824		52	2927		80	15429	
48h									
Vp447	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	1	$3,9 \times 10^6$	6×10^5	6,5	$3,7 \times 10^6$	$9,1 \times 10^4$	41
Vp1017	$1,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^3$	64	$5,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^2$	122	$9,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^1$	2600
/	18	1136		71	1333		41	2600	

Tab. 5 : Datentabelle zu Abb. 18. Mit "/" gekennzeichnete Spalten bzw. Zeilen geben den Quotienten der Werte der zwei darüber- bzw. davorstehenden Zeilen bzw. Spalten an.

Die Virusproduktion des Vp1017 war auf unbehandelten SK6-, PK15- und STE-Zellen um das 18-80-fache gegenüber dem Vp447 reduziert (Tab. 5). Das Vp447 wurde durch die IFN α -Behandlung der Zellen im Wachstum auf SK6-Zellen nicht inhibiert. Im Gegensatz dazu zeigte es auf PK15- und STE-Zellen eine Reduktion des Virustiters unter IFN-Gabe auf 8,9 – 35% des Wertes der unbehandelten Zellen. Durch IFN α -Behandlung wurde eine Inhibition des Wachstums des Vp1017 auf allen 3 Zelllinien erreicht. Die Titer bei IFN α -Gabe erreichten 0,04-1,6% der Werte der Negativkontrolle, was einer 20 – 300-fachen Reduktion gegenüber der IFN α -induzierten Reduktion des Vp447-Titers entspricht.

Diese Ergebnisse machten deutlich, dass eine Wachstumshemmung des Vp1017 auch in verschiedenen porzinen Zelllinien durch IFN α -Gabe ausgelöst wurde. Da die IFN α -Behandlung nach der Infektion erfolgte, konnte ein Effekt auf frühe Zeitpunkte der Infektion ausgeschlossen werden.

Um zu überprüfen, ob eine IFN α -Behandlung vor der Infektion zu einem Empfänglichkeitsverlust für das Vp1017 führen würde (in Analogie zu den

Primärzellen), wurden PK15- und STE-Zellen 16h vor der Infektion (-16h) oder 4h nach der Infektion (+4h) mit 300IU/ml IFN α behandelt. Unbehandelte Zellen der entsprechenden Zelllinie dienten bei diesem Versuch als Negativkontrolle. 24h nach der Infektion wurde die Anzahl der infizierten Zellen in den entsprechenden Verdünnungsstufen immunhistochemisch bestimmt und die Reduktion der Empfänglichkeit gegenüber der Negativkontrolle berechnet. Hieraus ergab sich für das Vp447 eine Empfänglichkeit der PK15-Zellen nach IFN α -Behandlung von 45,5% (-16h) bzw. 87,5% (+4h) und der STE-Zellen von 24% (-16h) bzw. 30,5% (+4h) (Abb. 19). Die Empfänglichkeit für das Vp1017 lag für IFN α -behandelte PK15-Zellen bei 5,5% (-16h) bzw. 26,5% (+4h) und für IFN α -behandelte STE-Zellen bei 0,45% (-16h) bzw. 3,5% (+4h). Dies ergibt eine Reduktion der Empfänglichkeit durch IFN α -Behandlung für das Vp1017 im Vergleich zum Vp447 um das Acht- (-16h) bzw. Dreifache (+4h) für PK15-Zellen und um das 53-fache (-16h) bzw. Neunfache (+4h) für STE-Zellen. Hieraus kann geschlossen werden, dass das Vp1017 sowohl in frühen Phasen der Infektion, als auch bei der Replikation und Partikelbildung, sensibler auf eine IFN α -Behandlung der getesteten Zelllinien reagiert als das Vp447.

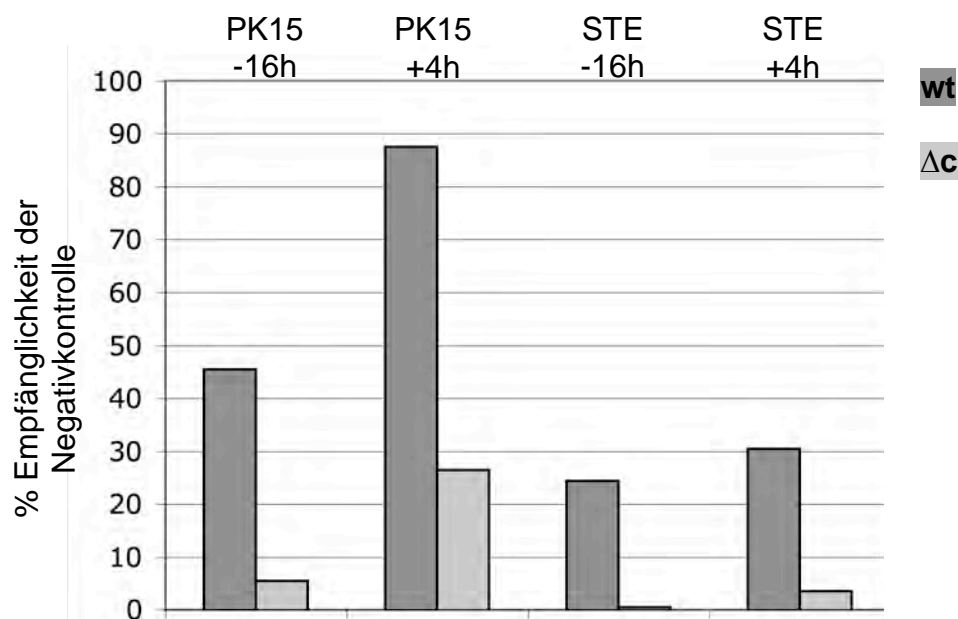


Abb. 19 : Empfänglichkeit von PK15- und STE-Zellen für das Vp1017 bzw. Vp447 in Prozent der Negativkontrolle (Empfänglichkeit der Negativkontrolle entspricht 100%) bei IFN α -Behandlung 16h vor (-16h) oder 4h nach (+4h) Infektion. Mittelwert aus n=2 unabhängigen Versuchen. wt = Vp447; Δc = Vp1017.

Für das BVDV wurde die Persistenz in der Zellkultur über mehrere Passagen unter IFN-Behandlung beschrieben (Schweizer et al., 2006). Es ist anzunehmen, dass auch das KSPV in der Zellkultur persistieren kann. Um dies zu überprüfen und dabei auch die Rolle des Core-Proteins zu untersuchen, wurden PK15-Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät und mit einer MOI von 1 infiziert. 24h nach der Infektion wurden 300IU IFN α / ml Medium zu den Zellen hinzugegeben. Zellen, die ohne IFN α im Medium inkubiert wurden, dienten dabei als Negativkontrolle. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage passagiert. Hierbei wurden 1×10^5 Zellen auf neue 6-Well-Platten umgesetzt und der Rest der Zellen, nach erneuter Anheftung, fixiert und durch immunhistochemischen Nachweis des viralen E2-Proteins auf die Anzahl der Antigen-positiven Zellen untersucht. Ausserdem wurde am Tag der Passage die Infektiosität im Überstand bestimmt.

Die mit Vp447 infizierten Zellen blieben unabhängig von der Behandlung in allen Passagen zu 100% infiziert. Der Titer fiel von Passage zu Passage ab. Dabei konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen IFN α -behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 20 und Tab. 6). Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl der Vp1017 infizierten Zellen unter IFN α -Gabe von Passage zu Passage deutlich ab, so dass bei der dritten Passage nur noch vereinzelt E2 positive Zellen nachgewiesen werden konnten. Ohne Zugabe von IFN α blieb die Anzahl der infizierten Zellen etwa konstant, erreichte aber nie 100%. Der Titer auf unbehandelten Zellen war gegenüber dem Vp447 in der ersten und zweiten Passage 73-fach vermindert, in der dritten Passage 30-fach. Auf IFN α -behandelten Zellen zeigten sich starke Unterschiede des Vp1017 im Vergleich zum Vp447 im Titerverlauf, da zum einen die Reduktion gegenüber der Negativkontrolle 9-35mal größer war als beim Vp447, und zum anderen in der dritten bzw. vierten Passage keine infektiösen Einheiten im Überstand mehr nachgewiesen werden konnten.

Daraus kann gefolgert werden, dass das Vp1017 im Gegensatz zum Vp447 nicht in der Lage ist, eine persistierende Infektion in IFN α -behandelten PK15-Zellen zu etablieren und während der Passagierung ausstirbt.

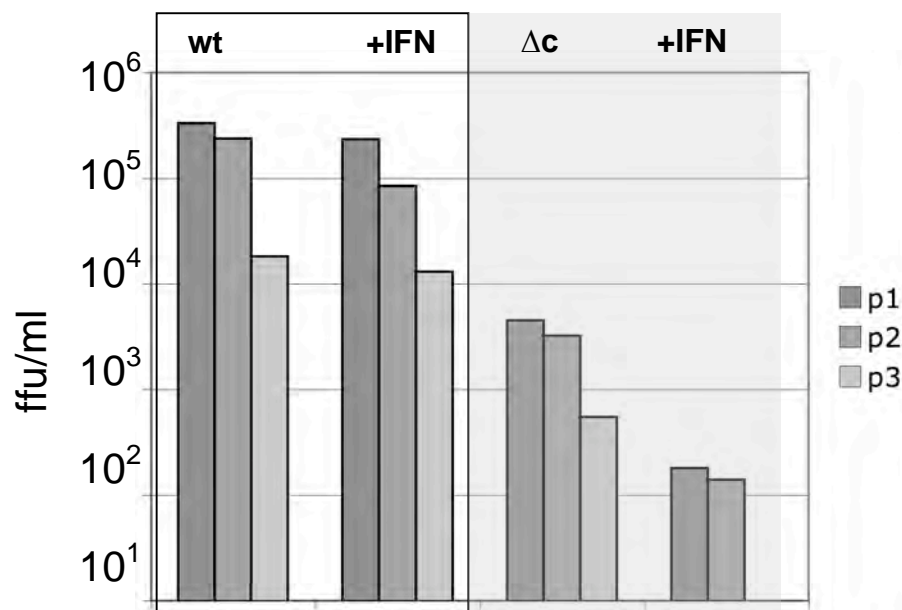


Abb. 20 : Vermehrung des Vp1017 bzw. Vp447 bei Passagierung von PK15-Zellen mit und ohne Gabe von IFN α (300IU/ml). Virustiter in ffu/ml Überstand während 3 Passagen (p1 / p2 / p3). Mittelwert aus 2 unabhängigen Versuchen. wt = Vp447; Δ c = Vp1017.

	p1	p2	p3
Vp447	331.000	236.000	18.300
Vp447+IFN	234.500	85.000	13.000
Vp1017	4.500	3.250	550
Vp1017+IFN	180	140	< 10

Tab. 6 : Datentabelle zu Abb. 20. Angabe der Titer in ffu/ml.

3.2.3 Untersuchung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch das Vp1017

In den vorangehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass das Vp1017 eine erhöhte Sensitivität gegenüber einem aktivierten IFN-System der Wirtszelle aufweist als das Vp447. Als nächstes war die Frage zu klären, ob das Vp1017 wie das Vp447 in der Lage ist, einer Aktivierung des IFN-Systems bei Infektion der Zellen entgegenzuwirken. Durch die IRF3-antagonisierende Aktivität des N^{pro} sollte das Vp1017 diese Signalkaskade genauso wie das Vp447 inhibieren. Es stellte sich jedoch die Frage, ob die Abwesenheit von Core während der Replikation zu einer IRF-3-unabhängigen Aktivierung des IFN-Sysytems führen könnte. Auch ein möglicher Funktionsverlust des N^{pro} durch veränderte, auf den C-Terminus folgende Sequenzen sollte hierdurch abgeklärt werden, da die Vermehrungseigenschaften des

Vp1017 auf primären Zellen dem eines ΔN^{pro} KSPV ähnelten (Tratschin et al., 1998; Ruggli et al., 2003).

Der Nachweis der Aktivierung des IFN-Systems erfolgte durch Western Blot Analyse der Expression von MxA (Haller et al., 1980). Hierzu wurden PK15-, SK6- und STE-Zellen mit einer MOI von 1 mit Vp447 oder Vp1017 auf 24-Well-Platten infiziert und nach 72h mit 1% Chaps-Puffer lysiert. SK6-Zellen dienten dabei als Negativkontrolle für eine Virus-induzierte Aktivierung des IFN-Systems, wohingegen Zellen zur Generierung einer Positivkontrolle mit 600IU/ml IFN α 4h nach Infektion behandelt wurden. Neben MxA wurde auch das virale Glykoprotein E2 als Indikator der viralen Proteinbiosynthese nachgewiesen (Abb. 21).

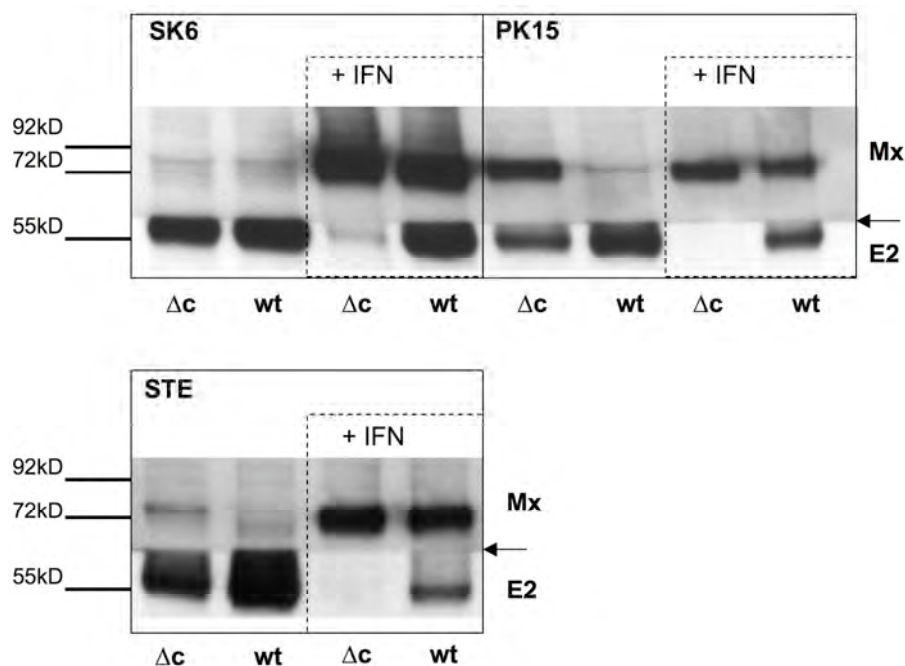


Abb. 21 : Nachweis von MxA (ca. 75kD) und viralem E2 (Monomer, ca. 55kD) in der Western Blot Analyse in Lysaten von SK6-, PK15- und STE-Zellen 72h nach Infektion mit Vp447 oder Vp1017 (MOI 1). Zugabe von IFN α (600IU/ml) als Positivkontrolle 4h nach der Infektion. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 7,5% Polyacrylamid-Gel. Die Western Blot Membran wurde auf Höhe des Pfeils durchtrennt und der Anteil des höheren Molekulargewichts mit anti-MxA mAk inkubiert, der des niedrigeren Molekulargewichts mit A18 anti-E2 mAk. wt = Vp447; Δc = Vp1017.

Die Infektion von STE- und PK15-Zellen mit dem Vp1017 führte zur Expression von MxA. Zusätzlich zeigte sich im Vergleich zu SK6-Zellen eine Verminderung der viralen Proteinbiosynthese, die auch in den Lysaten der IFN α -behandelten Positivkontrolle nachweisbar war. Dies bedeutet, dass das Vp1017 nicht nur sensibler auf eine Aktivierung des IFN-Systems der Wirtszelle reagiert als das Vp447, sondern auch nicht in der Lage ist, die Aktivierung des angeborenen Immunsystems der Wirtszelle zu verhindern.

3.3 Untersuchung der Funktionalität von N^{pro} in Core-Deletions-Mutanten des Vp447 durch Modifikation der N^{pro}-Spaltstelle

Die phänotypische Charakterisierung des Vp1017 in Kapitel 3.2 zeigte eine deutlich gesteigerte Sensitivität gegenüber einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems der Wirtszelle auf. Zusätzlich führte eine Infektion von PK15- und STE-Zellen mit dem Vp1017 zur Expression eines streng IFN-regulierten Gens. Im pestiviralen System steht mit N^{pro} jedoch ein effektiver Antagonist der IRF-3 abhängigen Aktivierungskaskade des IFN-Systems zur Verfügung. Da das Vp1017 im gesamten Verhalten eine sehr starke Analogie zum Verhalten von N^{pro}-Deletionsmutanten (Δ N^{pro}Vp447) aufwies (Tratschin et al., 1998; Ruggli et al., 2003; Bauhofer et al., 2005), war es notwendig, die Funktionalität von N^{pro} im Vp1017 näher zu untersuchen.

3.3.1 Nachweis von N^{pro} in der Western Blot Analyse und Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung von N^{pro} im Vp1017 war es wichtig, geeignete Nachweismöglichkeiten für das Protein zur Verfügung zu haben. Da kein Antikörper gegen das Vp447 N^{pro} vorhanden war, wurde auf den monoklonalen Antikörper 13B6 gegen das N^{pro} von BVDV zurückgegriffen und das entsprechende Epitop in p1017 (pCR3) und p447 (pJ41) kloniert. Durch das Einfügen des Epitops ausgelöste Veränderungen des Verhaltens von VpCR3 und VpJ41 im Vergleich zu den Viren ohne Epitop konnten in Vorversuchen nicht festgestellt werden. Die Detektion von N^{pro} in der Western Blot Analyse erfolgte in Lysaten von SK6-Zellen 24h nach Elektroporation mit VpJ41 - oder VpCR3-RNS. In einem 10% Polyacrylamid-Gel zeigte das N^{pro} ein apparentes Molekulargewicht von etwa 20kD. Der Nachweis von N^{pro} in mit pCR3-RNS transfizierten SK6-Zellen gestaltete sich im Vergleich zum pJ41 deutlich schwieriger und gelang erst nach mehreren Versuchen. Dabei fiel auf dass das N^{pro}-Molekulargewicht des VpCR3 im Vergleich zum VpJ41 geringgradig erhöht (etwa 1-2 kDa) war. Ausserdem ließ sich für das VpCR3 eine zusätzliche Bande bei etwa 24kDa erkennen (Abb. 22). Eine entsprechende Größenveränderung

des VpCR3 N^{pro} wäre zu erwarten, wenn die SP- und SPP-Spaltung (AS 255 bzw. 267 im Vp447 Polyprotein) anstatt der N^{pro}-Autoprotease den C-Terminus des VpCR3 N^{pro} generieren würden.

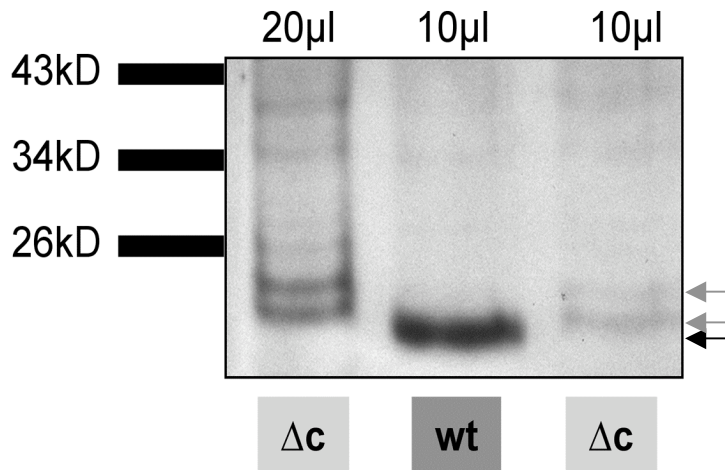


Abb. 22 : Nachweis von N^{pro} in der Western Blot Analyse in Lysaten (2%SDS) von mit genomischer RNS des VpJ41 oder VpCR3 transfizierten SK6-Zellen 24h nach Transfektion. Das N^{pro} des VpJ41 zeigt ein Signal bei etwa 20 kDa (schwarzer Pfeil), wohingegen für das N^{pro} des VpCR3 zwei Banden (graue Pfeile), bei etwa 22 und 24 kDa, sichtbar sind. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10% Polyacrylamid-Gel. wt = VpJ41; Δc = VpCR3.

Um zu ermitteln, ob die Veränderung der Größe des N^{pro} des VpCR3 auch Auswirkungen auf seine Lokalisation in der Zelle hat, wurden N^{pro}, die zelluläre DNS (DAPI) und das endoplasmatische Retikulum (ER) (durch Nachweis von Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)) in der Immunfluoreszenz an einem konfokalen Mikroskop dargestellt. SK6-Zellen, die mit genomischer RNS des VpJ41 transfiziert worden waren, zeigten nach 24h eine diffuse Verteilung des N^{pro}-Signals in Zytoplasma und Zellkern (Abb. 23). Hingegen war das N^{pro}-Signal in mit genomischer RNS des VpCR3 transfizierten SK6-Zellen schwach und granulär im Bereich des ERs – anhand der Kolo-kalisation mit PDI - nachweisbar. Zellen der Negativkontrolle zeigten kein spezifisches Signal für das N^{pro}. Die Veränderung der subzellulären Lokalisation des VpCR3 N^{pro} wäre durch Verbleib der AS 247-255 bzw. -267 des Vp447 Polyproteins am C-Terminus des N^{pro} erklärbar, da diese Sequenzen einen Teil des Signalpeptids des viralen Genoms darstellen.

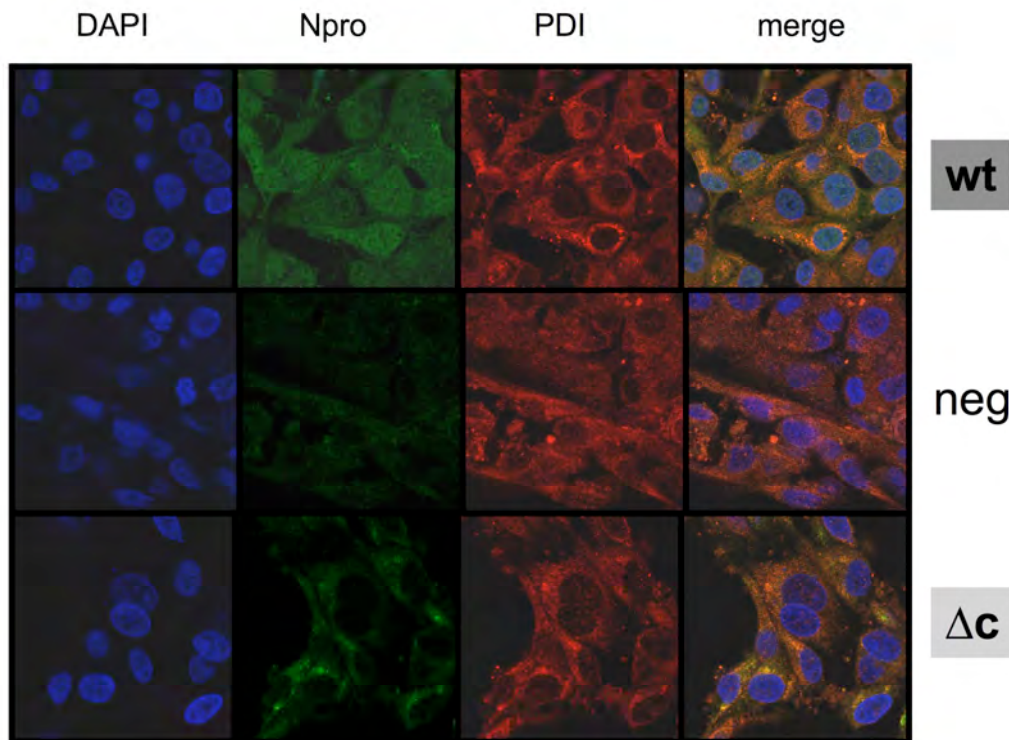


Abb. 23: Nachweis von N^{pro}, zellulärer DNS und PDI in mit genomischer RNS des VpJ41 oder VpCR3 transfizierten SK6-Zellen nach 24h mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Die Detektion von N^{pro} erfolgte mit dem mAk 13B6 (grün). DNA wurde mittels DAPI angefärbt (blau) und PDI mit einem Kaninchen mAk markiert (rot). Als Sekundärantikörper dienten ein Alexa488-markiertes Ziegen Serum anti-Maus und ein Cy3-markiertes-Ziegen Serum anti-Kaninchen. Überlagerungen des Signals von N^{pro} und PDI ergeben eine gelbliche Färbung, Überlagerungen des Signals von N^{pro} und DAPI eine weißliche. wt = VpJ41; Δc = VpCR3; neg = Negativkontrolle.

Zur Überprüfung des zellulären N^{pro}-Gehalts wurden SK6-Zellen mit genomischer RNS des VpJ41 oder VpCR3 transfiziert und nach 24h in 2% SDS-Puffer lysiert. Lysate von pJ41-RNS transfizierten Zellen wurden in abnehmenden Mengen aufgetragen, um diese dann mit dem N^{pro}-Signal des Lysats von mit pCR3-RNS transfizierten Zellen vergleichen zu können. Als Expressionsstandard wurde neben N^{pro} auch E2 nachgewiesen (Abb. 24). Zusätzlich wurde auch eine Lysis der Zellen in nicht denaturierendem Puffer vorgenommen (1% Chaps) um zu überprüfen, ob nach der Zelllysis eine Generierung von N^{pro} mit Molekulargewicht des Wildtyps (ca. 20kD) erfolgen würde.

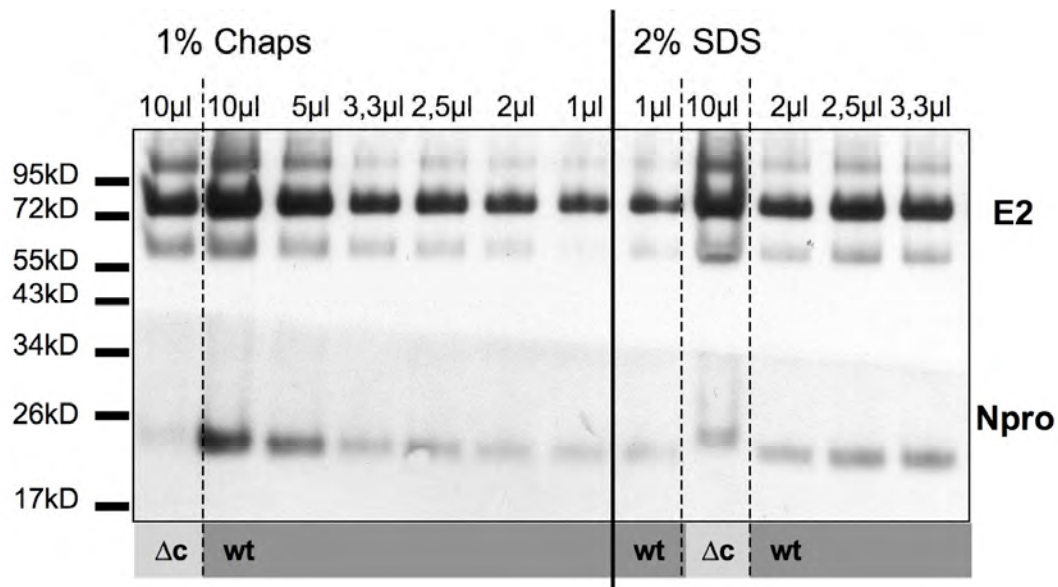


Abb. 24 : Analyse des relativen zellulären N^{pro}-Gehalts in Lysaten (1% Chaps oder 2% SDS) von mit pJ41- und pCR3-RNS transfizierten SK6-Zellen nach 24h. Das VpJ41-Lysat wurde in abnehmenden Mengen aufgetragen und das E2-Signal (Monomer, Hetero- und Homodimer) als Vergleichswert verwendet. Die Proben wurden in einem 7,5% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. wt = VpJ41; Δc = VpCR3.

Anhand dieser Western Blot Analyse konnte eine deutliche Reduktion der zellulären N^{pro}-Menge für das VpCR3 im Vergleich zum VpJ41 (etwa fünffach, auf Grund des Vergleichs mit dem E2-Signal) nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte das N^{pro} der Lysate VpCR3-replizierender SK6-Zellen je nach verwendetem Lysispuffer eine unterschiedliche Größe. Im Zelllysat von 1% Chaps-Puffer war das N^{pro} des VpCR3 bei etwa 20kD detektierbar, wohingegen das N^{pro} des VpCR3 im Lysat von 2% SDS-Puffer eine Größe von etwa 24kD aufwies. Dies spricht dafür, dass die Autoproteaseaktivität des VpCR3 N^{pro} grundsätzlich intakt ist.

3.3.2 Untersuchung der N^{pro}-Funktion mittels Mutagenese der N^{pro}-Core Spaltstelle

3.3.2.1 Modifikation der Spaltstelle mit authentischen Aminosäuren

Durch die Untersuchung des VpCR3-N^{pro} konnte gezeigt werden, dass in diesem Virus die autoproteolytische Abspaltung des N^{pro} vom Polyprotein beeinträchtigt ist. Um diesen Funktionsverlust näher zu untersuchen sollten zuerst Teile der authentischen Core-Proteinsequenz nach der Spaltstelle wiederhergestellt werden. Hierzu wurden Abkömmlinge des pCR3 generiert, die für die ersten zehn (pCR27),

acht (pCR37), sieben (pCR50), sechs (pCR39), fünf (pCR90) und drei N-terminalen AS (pCR51) des authentischen Core-Proteins nach dem Serin Position 169 kodierten (Abb. 25)

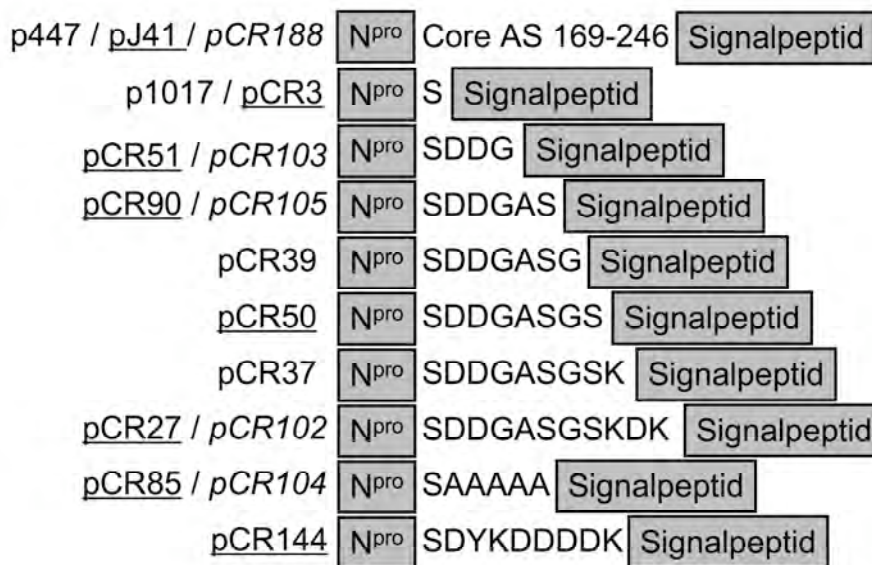


Abb. 25 : Schematische Darstellung der generierten Modifikationen an der N^{pro}-Core-Spaltstelle. Signalpeptid = AS 247-267 des Vp447 Polyproteins. Plasmide, die das Epitop des mAk 13B6 kodieren sind unterstrichen. Wenn zusätzlich die N^{pro}-Autoprotease durch Mutagenese des Cysteins 69 zu Alanin inaktiviert wurde, sind die entsprechenden Plasmide kursiv geschrieben.

Daraufhin fand eine Charakterisierung des N^{pro} dieser Viren mittels Western Blot Analyse auf Spaltaktivität sowie IRF-3 antagonistische Wirkung durch Untersuchung der MxA-Expression statt. Zusätzlich wurde die subzelluläre Lokalisation des N^{pro} 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in der Immunfluoreszenz beurteilt. Dafür war es nötig, das Epitop des Antikörpers 13B6 in die oben genannten Klone einzufügen (vgl. 3.2.1).

Abkömmlinge des VpCR3, die für fünf (VpCR90) oder mehr authentische N-terminale AS des Core-Proteins kodierten, zeigten in der Western Blot Analyse ein N^{pro}-Molekül, das in Bezug auf Menge und Größe keine Unterschiede zum N^{pro} des VpJ41 (Wildtyp) aufwies. Im Gegensatz dazu verhielt sich das N^{pro} des VpCR51 (VpCR3 mit 3 authentischen Core-AS) in der Western Blot Analyse vergleichbar dem des VpCR3 (Abb. 32). Auch bei der Untersuchung der subzellulären Verteilung des N^{pro} mittels Immunfluoreszenz zeigte sich, dass fünf authentische AS des Core-Protein N-Terminus ausreichend waren, um ein dem VpJ41 analoges subzelluläres Verteilungsmuster zu erhalten (Abb. 30). Das VpCR51 zeigte hingegen ein granuläres subzelluläres Verteilungsmuster, vergleichbar dem des VpCR3. Zur Überprüfung der Funktionalität des N^{pro} im Bezug auf die Antagonisierung von IRF-3 wurden PK15-Zellen mit einer MOI von 1 infiziert und 72h später das Lysat (in 1%

Chaps-Puffer) in der Western Blot Analyse auf das Vorhandensein des MxA-Proteins untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass fünf authentische Core-AS ausreichend waren, um eine Expression von MxA zu verhindern (Abb. 28).

Um die Eigenschaften des VpCR90 und VpCR51 weiter zu definieren wurden Kinetiken der viralen Vermehrung erstellt. Hierzu wurden SK6-, PK15- und STE-Zellen mit genomischer RNS transfiziert bzw. mit den entsprechenden Viren infiziert und die Infektiosität im Überstand an verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion / Infektion bestimmt. Als Kontrollvirus diente neben dem Vp447 und Vp1017 auch ein Vp447 mit Deletion des N^{pro}-Gens (Vp451). Der Titer wurde 8, 12, 24 und 48h nach Transfektion bestimmt (Abb. 26). Hierbei zeigte sich eine klare Unterteilung in zwei Gruppen. Für das VpCR90 und das Vp447 waren schon nach 8h mehr als 1×10^3 ffu/ml im Überstand nachweisbar. Hingegen war zu diesem Zeitpunkt noch kein Nachweis des VpCR51, VpCR3 oder Vp451 im Überstand möglich (Nachweisgrenze = 10 ffu/ml). Neben der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit zeigte das VpCR51 einen im Vergleich zum VpCR90 nach 24h mehr als 200-fach reduzierten Titer (Tab. 7).

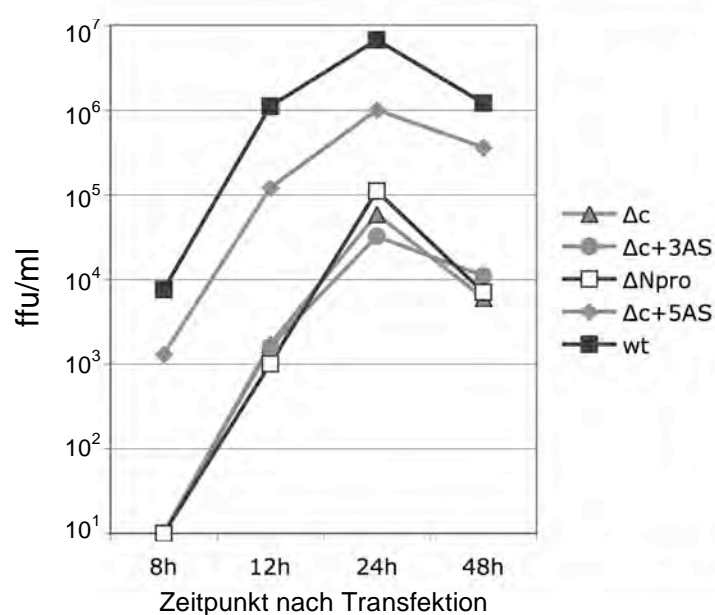


Abb. 26 : Infektiosität im Überstand von SK6-Zellen 8, 12, 24 und 48h nach Transfektion der genomischen RNS von Vp447, Vp1017, VpCR51, VpCR90 und Vp451 (ffu/ml). wt = Vp447; Δc+3AS = VpCR51; Δc+5AS = VpCR90, Δc = Vp1017; ΔNpro = Vp451.

Virus	8h	12h	24h	48h
Vp1017	10	1.700	59.000	6.000
VpCR51	10	1.600	32.000	11.000
Vp451	10	1.000	110.000	7.000
VpCR90	1.300	120.000	1.000.000	360.000
Vp447	7.600	1.100.000	6.700.000	1.200.000

Tab. 7 : Datentabelle zu Abb. 26, Virustiter in ffu/ml.

Für die Bestimmung der viralen Vermehrung nach Infektion wurden 1×10^5 SK6-, PK15- und STE-Zellen mit einer MOI von 1 mit Vp447, Vp1017, VpCR90 und Vp451 für 4h infiziert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS_{defic} gewaschen und frisches Medium auf die Zellen pipettiert. Die Infektiosität im Überstand wurde nach 12, 24 und 48h gemessen (Abb. 27 und Tab. 8).

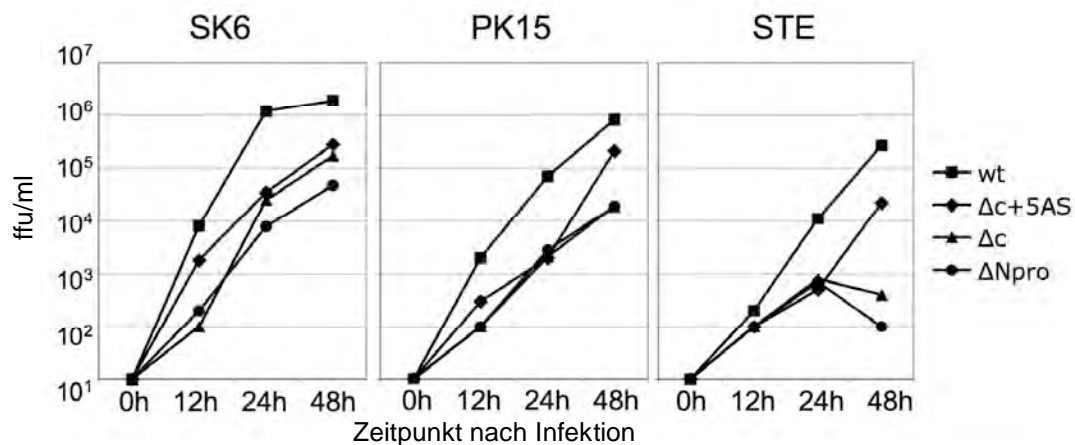


Abb. 27 : Virusproduktion von SK6-, PK15- und STE-Zellen 12, 24 und 48h nach Infektion (MOI 1) mit Vp447, Vp1017, VpCR90 oder Vp451 (ffu/ml). Δc = Vp1017; $\Delta c+5AS$ = VpCR90; $\Delta Npro$ = Vp451; wt = Vp447; PK15 = PK15-Zellen; SK6 = SK6-Zellen; STE = STE-Zellen.

Virus und Zelllinie	12h	24h	48h
Vp447 SK6	8.000	1.200.000	1.900.000
Vp447 PK	2.000	70.000	820.000
Vp447 STE	200	11.000	270.000
VpCR90 SK6	1.800	35.000	280.000
VpCR90 PK	300	2.000	210.000
VpCR90 STE	100	500	22.000
Vp1017 SK6	100	25.000	170.000
Vp1017 PK	100	2.100	19.000
Vp1017 STE	100	800	400
Vp451 SK6	200	7.800	48.000
Vp451 PK	100	2.800	19.000
Vp451 STE	100	700	100

Tab. 8 : Datentabelle zur Abb. 27. Titer in ffu/ml.

Die Bestimmung der viralen Vermehrung nach Infektion verschiedener porziner Zelllinien ergab, dass das Vp451 und das Vp1017 im Vergleich zum Vp447 und VpCR90 eine Verzögerung der Partikelproduktion in SK6-Zellen aufweisen. Der Verlauf der Wachstumskurve des VpCR90 war mit derjenigen des Vp447 vergleichbar, jedoch waren die erreichten Titer 4-25mal geringer als die entsprechenden Titer des Vp447. Der Titer des Vp1017 und Vp451 auf STE- und PK15-Zellen nach 48h war um mehr als das Zehnfache geringer als der Titer des VpCR90. Auf STE-Zellen zeigte sich sogar ein Abfallen der Titer nach 48h für das Vp451 und das Vp1017, was für eine Unfähigkeit zur Ausbreitung und den Verlust von infizierten Zellen spricht.

Aus diesen Versuchen ging hervor, dass durch das Einfügen der fünf authentischen N-terminalen Core-AS an der N^{pro}-Spaltstelle eine deutliche Veränderung des Phänotyps erreicht wurde. Das VpCR90 zeigte keine Anzeichen eines N^{pro}-Defekts - im Gegensatz zum Vp1017 - was sich neben den Auswirkungen auf die N^{pro}-Prozessierung und das angeborene Immunsystem auch in verbesserten Wachstumseigenschaften niederschlug.

3.3.2.2 Modifikation der N^{pro}-Core-Spaltstelle mit nicht-authentischen Aminosäuren

Wie in Kapitel 3.3.2.1 gezeigt war die Insertion von fünf authentischen N-terminalen Core-AS ausreichend, um eine weitgehende Veränderung der Eigenschaften des Vp1017 zu bewirken. Jedoch war es wichtig zu wissen, ob die Identität oder die Länge der Aminosäuresequenz, die sich C-terminal an das N^{pro} anschließt, ausschlaggebend ist für die Wiederherstellung der N^{pro}-Funktion. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurden p447-Abkömmlinge verwendet, die N-terminale Deletionen von 2, 7 und 9 AS im Core-Protein aufweisen und das Epitop des mAk 13B6 kodieren (pCR112 aus p447_{Δ170-171}, pCR113 aus p447_{Δ170-176}, pCR114 aus p447_{Δ170-178}) (s. Kap. 3.1.1). Andererseits wurden an den N^{pro} C-Terminus im pCR3 nach dem Serin Position 169 fünf Alanine (pCR85) bzw. ein Flag-Tag (DYKDDDDK) (pCR144) angehängt. Die Untersuchung des N^{pro} in diesen Viren erfolgte mittels Western Blot Analyse 24h nach Elektroporation der entsprechenden RNS in SK6-Zellen. Hierdurch sollten Menge und Größe des exprimierten N^{pro}

abgeschätzt werden. Die Detektion von MxA 72h nach Infektion von PK15-Zellen diente dem Nachweis der IRF-3 Antagonisierung durch N^{pro}. Unterschiede in der subzellulären Verteilung wurden mittels Immunfluoreszenz an mit entsprechender genomischer RNS transfizierten SK6-Zellen 24h nach Transfektion untersucht (Abb. 30).

Lysate von VpCR112-, VpCR113- und VpCR114-RNS transfizierten SK6-Zellen zeigten in der Western Blot Analyse ein N^{pro}-Signal bei 20kD (Abb. 31). Bei Infektion von PK15- Zellen mit diesen Viren kam es nicht zu einer Expression von MxA. In der Immunfluoreszenz wies das N^{pro} eine diffus cytoplasmatische und nukleäre Verteilung wie das Vp447 auf. Auch eine Insertion von nicht-authentischen Sequenzen an der N^{pro}-Core-Spaltstelle war ausreichend, um den IRF-3 Antagonismus des N^{pro} wiederherzustellen, und daher die Expression von MxA zu verhindern (Abb. 28). Jedoch zeigte das VpCR85 Abweichungen vom Vp447 in der subzellulären Verteilung des N^{pro} in der Immunfluoreszenz, da kaum N^{pro}-Signal im Kern nachweisbar war. Zusätzlich war in der Western Blot Analyse neben einer Bande bei 20kD noch eine Bande des N^{pro} bei etwa 24kD detektierbar (Abb. 29). Das VpCR144 verhielt sich hingegen in allen diesen Aspekten wie das Vp447.

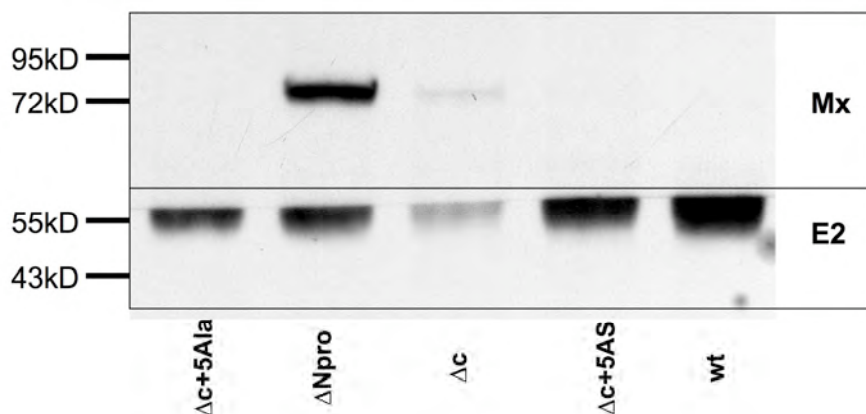


Abb. 28 : Nachweis von MxA (ca. 75kD) und viralem E2 (Monomer, ca. 55kD) in Lysaten von mit Vp1017, VpCR85, VpCR90, Vp451 oder Vp447 infizierten PK15-Zellen (MOI 1) 72h nach Infektion in der Western Blot Analyse. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 7,5% Polyacrylamid-Gel verwendet. Δc = Vp1017; Δc+5Ala = VpCR85; Δc+5AS = VpCR90; ΔNpro = Vp451; wt = Vp447.

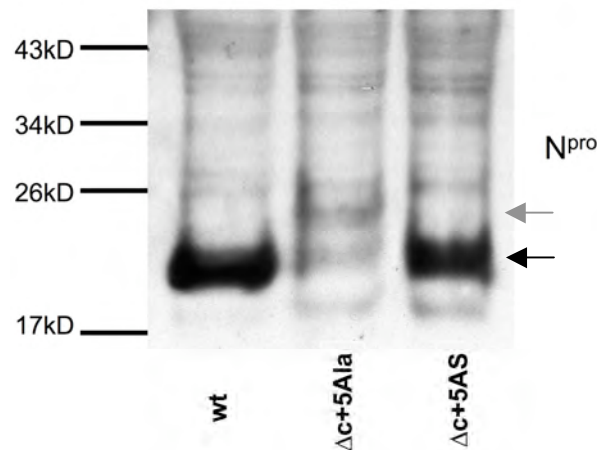


Abb. 29 : Western Blot Analyse des N^{pro} des Vp447, VpCR85 und VpCR90 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen. Die Auftrennung der Proteine wurde in einem 10% Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Der schwarze Pfeil markiert das N^{pro}-Signal bei etwa 20kD, der graue Pfeil das N^{pro}-Signal bei etwa 24kD. Δc+5Ala = VpCR85; Δc+5AS = VpCR90; wt = Vp447.

3.3.2.3 Modifikation der Protease-Aktivität des N^{pro}

Das veränderte N^{pro}-Verhalten des VpCR85, durch den Nachweis einer zusätzlichen Bande bei etwa 24kD vergleichbar dem des VpCR3 in der Western Blot Analyse, warf zwei Fragen auf: War diese Veränderung auf eine Verhinderung der autoproteolytischen Abspaltung des N^{pro} zurückzuführen? Und war die autoproteolytische Aktivität des N^{pro} wichtig für die Verhinderung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems?

Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen wurde im pJ41, pCR51, pCR90, pCR85 und pCR27 die Aminosäure 69 von Cystein nach Alanin mutagenisiert (pCR188 aus pJ41, pCR103 aus pCR51, pCR105 aus pCR90, pCR104 aus pCR85, pCR102 aus pCR27) (Abb. 25). Diese Modifikation der katalytischen Domäne des N^{pro} führt zu einer vollständigen Inaktivierung der Protease (Rümenapf et al., 1998).

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des N^{pro} der Viren mit inaktiver Protease ergab eine dem VpCR3 vergleichbare granuläre Verteilung (Abb. 30). Auch das N^{pro} des VpCR51 zeigte in der Immunfluoreszenz eine dem VpCR3 analoge Signalverteilung. Hingegen war die subzelluläre Verteilung des N^{pro} des VpCR90 und VpCR144 mit dem N^{pro} des VpJ41 vergleichbar, da sich N^{pro} diffus in Zytoplasma und Zellkern nachweisen ließ. Das N^{pro} des VpCR85 zeigte eine vom VpCR3 und VpJ41 abweichende subzelluläre Lokalisation, da das N^{pro} zwar auch im Zellkern

nachweisbar war, jedoch im Vergleich zum VpJ41 dort eine deutlich reduzierte Signalstärke aufwies.

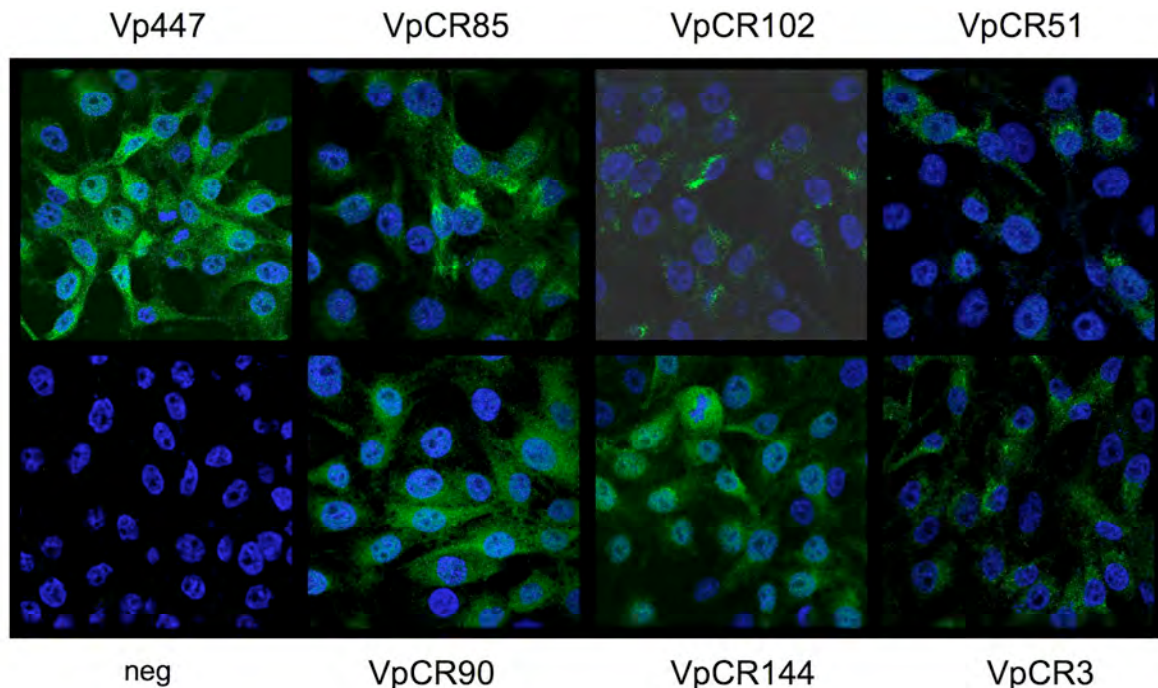


Abb. 30 : Darstellung des N^{pro} (grün) und der zellulären DNS (blau) in der Immunfluoreszenz an SK6-Zellen 24h nach Transfektion von VpJ41-, VpCR51-, VpCR3-, VpCR90-, VpCR144-, VpCR85 - und VpCR102- RNS. Zum Nachweis von N^{pro} wurde der mAK 13B6 und ein Cy3-markiertes Ziegenserum anti-Maus verwendet. Die Detektion der DNS erfolgte durch Einlagerung von DAPI.

In der Western Blot Analyse der Lysate von mit entsprechender genomischer RNS transfizierten SK6-Zellen zeigten die Viren mit inaktiver N^{pro}-Autoprotease die zu erwartende Größenveränderung durch die Unfähigkeit der Abspaltung des N^{pro} von der Sequenz des Signalpeptids (Abb. 31). Durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 konnte das N^{pro}-Signal bei Viren mit schwacher Expression / verringerter Stabilität des N^{pro} verstärkt werden und erleichterte somit den Größenvergleich (Abb. 32).

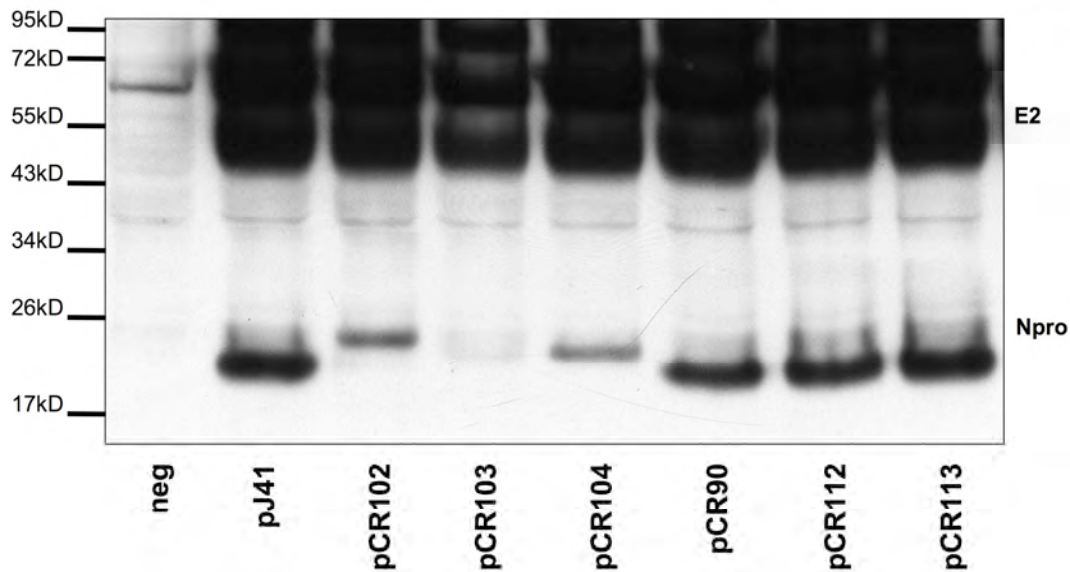


Abb. 31 : Western Blot Analyse des N^{pro} in Lysaten (2%SDS) von SK6-Zellen 24h nach Transfektion von pJ41-, pCR102-, pCR103-, pCR104-, pCR90-, pCR112- und pCR113- RNS. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10% Polyacrylamid-Gel. neg = Negativkontrolle. Der Nachweis des E2-Proteins diente als Ladungskontrolle für virales Protein.

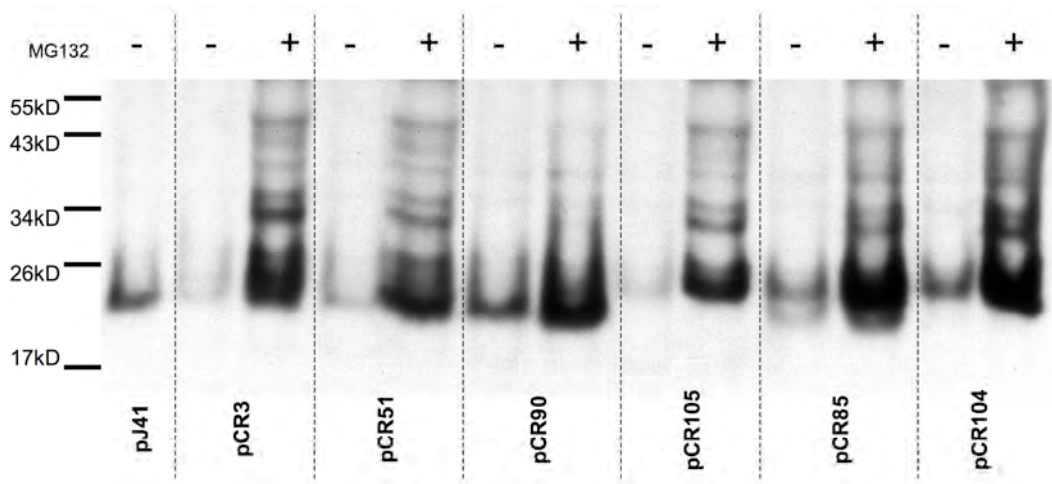


Abb. 32 : Western Blot Analyse des N^{pro} im Zelllysat (2% SDS) von SK6-Zellen 24h nach Transfektion von pJ41-, pCR3-, pCR51-, pCR90-, pCR105-, pCR85- oder pCR104-RNS. Die MG132 Zugabe (10µg/ml) erfolgte 6h vor Zelllysis. Die Proteine wurden in einem 10% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Weiterhin fiel auf, dass das N^{pro}-Signal im Vergleich zu den Klonen mit intakter Proteaseaktivität in den Lysaten der SK6-Zellen schwächer erschien. Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit dem Verhalten des VpCR3 N^{pro}, da hier auch eine Größenzunahme und eine Abschwächung der Signalstärke erkennbar war (s. Kap. 3.3.2). Es lag daher nahe, als nächstes die IRF-3 antagonisierende Wirkung des N^{pro} mittels rekombinanter Viren mit defekter N^{pro}-Autoproteaseaktivität zu untersuchen. Da das VpCR188 (VpJ41 C69A) weniger als 1×10^4 ffu/ml (24h nach Transfektion in SK6) freisetzte, wurde ein VpCR188 mit kompensatorischer Mutation des Vp1017 in

der NS3-Helikasedomäne (N2177Y) generiert (VpCR189). Hierdurch war es möglich, Titer von 5×10^5 - 1×10^6 ffu/ml (24h nach Transfektion der entsprechenden RNS in SK6-Zellen) von einem Wildtyp KSPV mit inaktiver N^{pro}-Autoprotease zu erhalten. Nach Infektion von PK15-Zellen für 72h mit VpCR104, VpCR102 oder VpCR189 war das MxA-Protein in der Western Blot Analyse bei Verwendung einer MOI von 1 nachweisbar (Abb. 33).

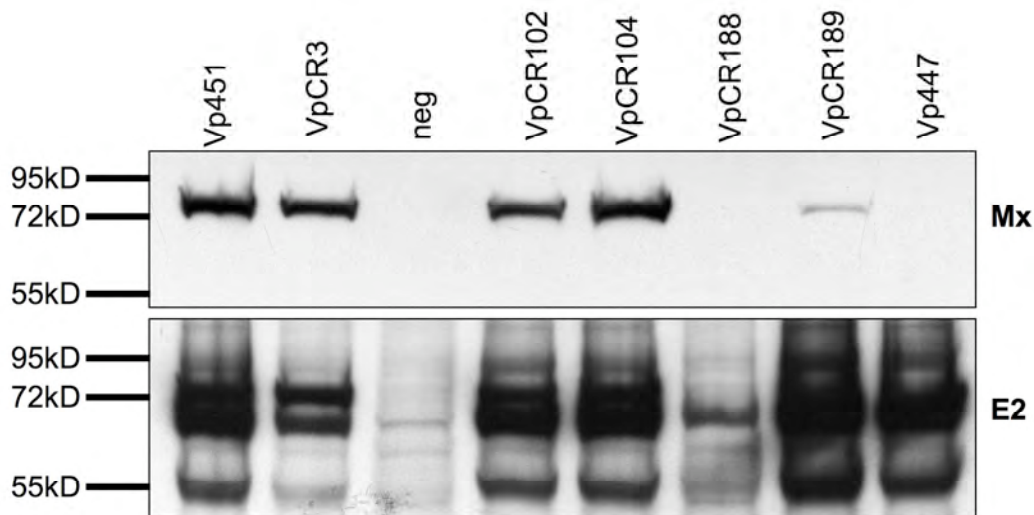


Abb. 33 : Nachweis des MxA- und E2-Proteins in der Western Blot Analyse in Lysaten von PK15-Zellen 72h nach Infektion mit Vp451, Vp1017, VpCR104, VpCR102, VpCR189, VpCR188 oder Vp447. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10% Polyacrylamid-Gel. neg = Negativkontrolle.

3.4 Charakterisierung des VpCR85

Für das originäre Vp1017 konnte in den vorangehenden Abschnitten gezeigt werden, dass eine erhöhte Sensitivität des Virus gegenüber einer Aktivierung des IFN-Systems der Wirtszellen besteht, die sich sowohl auf die Infektionseffizienz als auch die Virusproduktion auswirkt. Zusätzlich wies das N^{pro} des Vp1017 einen Defekt der Antagonisierung des IRF-3 auf. Dieser wird durch die direkte Fusion des N^{pro} mit dem Signalpeptid hervorgerufen. Somit konnten Versuche, die mit dem Vp1017 durchgeführt wurden, keine sichere Aussage über eine mögliche Rolle des Core-Proteins im Schutz vor dem angeborenen Immunsystem liefern. Um diese Fragestellung zu bearbeiten wurde ein Virus benötigt, das trotz fehlendem Core-Protein eine intakte Funktion des N^{pro} aufweist. Auf Grund der Wachstumseigenschaften und der Abwesenheit von authentischen Core-Sequenzen

bis auf das Signalpeptid wurde das Vp1017 mit 5 Alaninen als Linker zwischen N^{pro} und Signalpeptid (VpCR85) für die weiteren Versuche ausgewählt.

3.4.1 Wachstumseigenschaften des VpCR85 in verschiedenen porzinen Zelllinien

Zunächst sollte zur Charakterisierung der Sensitivität des VpCR85 gegenüber der IFN-Behandlung von porzinen Zelllinien das Wachstum auf SK6-, PK15- und STE-Zellen bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen 16h vor Infektion oder 4h nach Infektion mit 600IU IFN α /ml Medium behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 1 für 4h. Für das Vp447 wurde auch eine MOI von 0,1 bei der Gabe von IFN α 16h vor der Infektion eingesetzt, um die Ausbreitung besser beurteilen zu können. Ausserdem hatten Versuche mit dem Vp1017 gezeigt, dass dessen Infektionseffizienz bei aktiviertem IFN-System der Wirtszelle um das etwa Zehnfache im Vergleich zum Vp447 vermindert ist. Nach 24h und 48h wurde der kumulative Titer in ffu/ml Überstand bestimmt (Abb. 34 und 35 sowie Tab. 9 und 10).

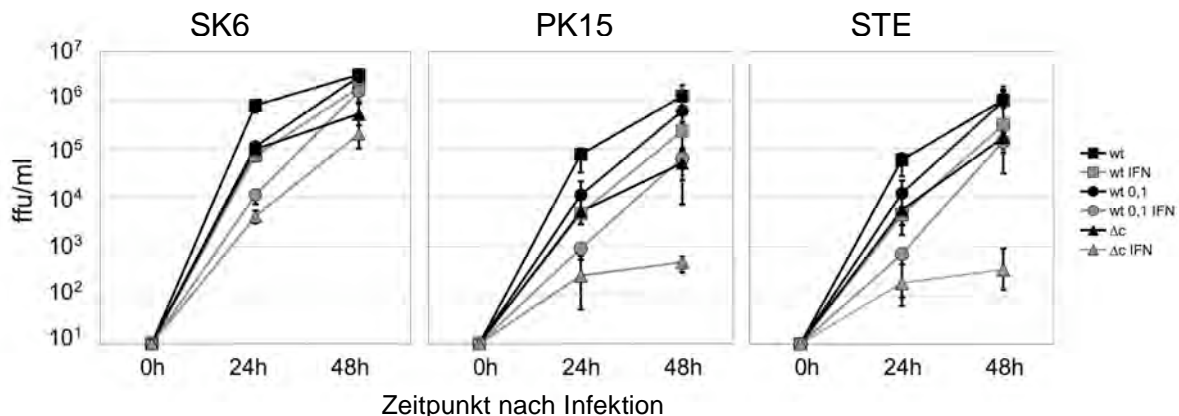


Abb. 34 : Vermehrung des Vp447 und VpCR85 in SK6-, PK15- und STE-Zellen 24h und 48h nach Infektion (ffu/ml). Die IFN α -Gabe erfolgte 16h vor der Infektion mit VpCR85 (MOI 1) bzw. Vp447 (MOI 1 und 0,1). Titer der Zellen der Negativkontrolle sind in schwarz abgebildet, die der IFN α -behandelten Zellen in dunkelgrau. Dargestellt sind Median, Maximum und Minimum aus 3 unabhängigen Versuchen. wt = Vp447; wt0,1 = Vp447 MOI 0,1; Δ c = VpCR85.

24h	PK15	+IFN	%	STE	+IFN	%
wt	69.333	42.667	62	55.333	4.100	7
wt 0,1	12.000	843	7	12.733	563	4
Δc	4.467	310	7	4.833	223	5
48h						
wt	1.183.333	342.667	29	1.133.333	831.667	71
wt 0,1	566.667	50.000	9	1.046.667	127.000	12
Δc	54.000	460	0,9	204.333	460	0,2

Tab. 9 : Mittelwerte der Infektiosität im Überstand (ffu/ml) von PK15- und STE-Zellen mit und ohne IFN α -Behandlung 16h vor Infektion mit Vp447 (MOI 1 und 0,1) oder VpCR85 (MOI 1). Berechnet aus n=3 unabhängigen Versuchen. % = (Zellen behandelt mit IFN α / Zellen unbehandelt)*100. Abkürzungen s. Abb. 34.

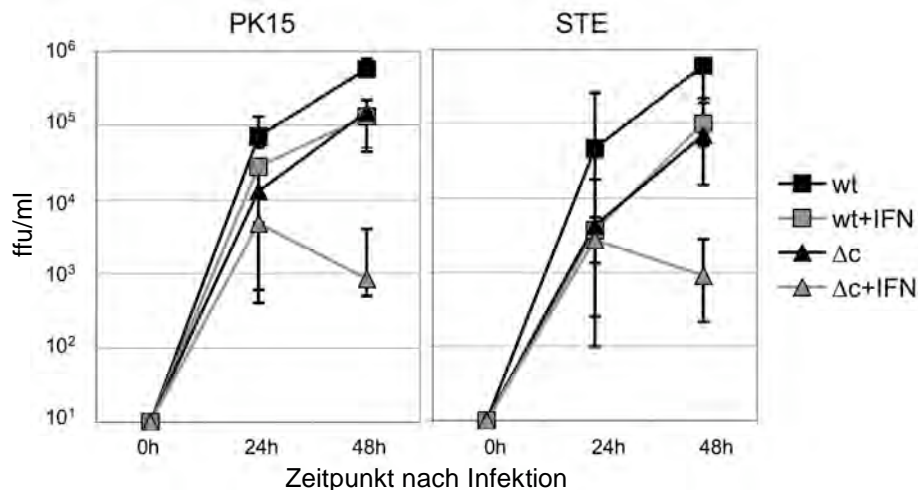


Abb. 35 : Titer von mit Vp447 oder VpCR85 infizierten PK15- und STE-Zellen (ffu/ml) 24h und 48h nach Infektion bei IFN-Gabe 4h nach Infektion. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 1 für 4h. Titer der Zellen der Negativkontrolle sind in schwarz, die IFN α -behandelter Zellen in dunkelgrau dargestellt. Die Grafik zeigt Median, Maximum und Minimum aus 3 unabhängigen Versuchen. wt = Vp447; Δc = VpCR85 .

24h	PK15	+IFN	%	STE	+IFN	%
Vp447	68.333	14.933	22	114.000	7.667	7
VpCR85	15.200	3.367	22	20.183	2.766	14
48h						
Vp447	643.333	130.000	20	493.333	78.333	16
VpCR85	138.000	1.783	1,3	113.333	1.300	1,1

Tab. 10 : Mittelwerte der Infektiosität im Überstand von PK15- und STE-Zellen mit und ohne IFN-Behandlung 4h nach Infektion mit Vp447 oder VpCR85 (ffu/ml). Berechnet aus n=3 unabhängigen Versuchen. % = s. Tab. 9.

Im Vergleich zu vorherigen Versuchen mit dem Vp1017 zeigte das VpCR85 eine vermehrte Virusproduktion sowohl 24h als auch 48h nach der Infektion, wenn die

Zugabe von IFN α 4h nach der Infektion erfolgte. Jedoch war 48h nach der Infektion eine Reduktion der Infektiosität im Überstand des VpCR85 nachweisbar, die mehr als das Zehnfache der Reduktion des Vp447 betrug. Wurde die Behandlung mit IFN α 16h vor der Infektion durchgeführt, wies das VpCR85 nach 48h ein mehr als 200-fach verringertes Wachstum im Vergleich zum Vp447 auf. Das Vp447 zeigte initial eine deutliche Verminderung des Titers durch IFN α -Vorbehandlung, die jedoch nach 48h weitgehend kompensiert werden konnte. Gleiches galt auch bei der Infektion mit einer MOI von 0,1.

Um die Ausbreitung der Viren nach Infektion der Zellen zu beurteilen wurde das virale E2-Protein immunhistochemisch in den infizierten Zellen 48h nach Infektion dargestellt (Abb. 36).

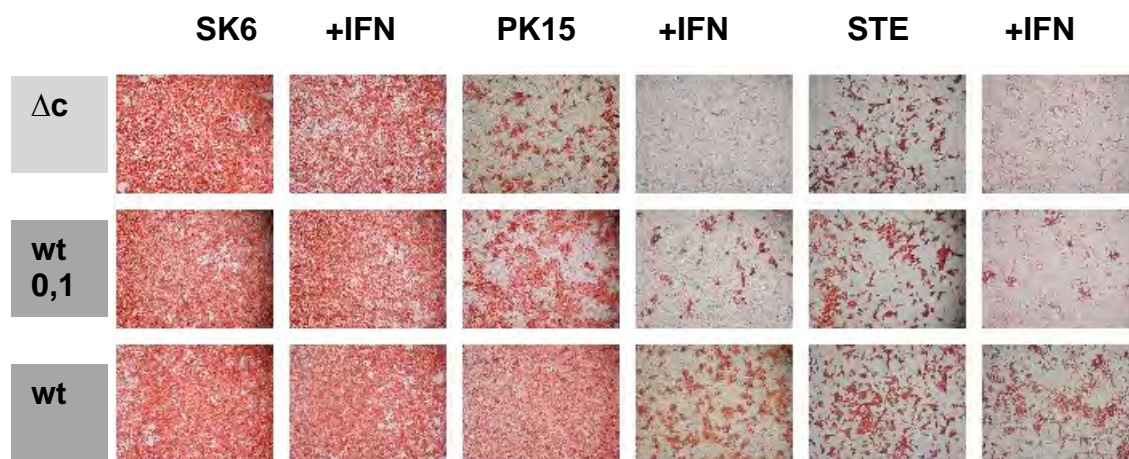


Abb. 36 : Immunhistochemischer Nachweis des viralen E2-Proteins 48h nach Infektion von SK6-, PK15- und STE-Zellen mit Vp447 (MOI 1 und 0,1) oder VpCR85 (MOI 1). Die Behandlung der Zellen mit IFN α erfolgte 16h vor der Infektion (600IU/ml). wt = Vp447; wt 0,1 = Vp447 MOI 0,1; Δc = VpCR85.

Der Nachweis des viralen E2-Antigens in den Zellen machte deutlich, dass das VpCR85 im Vergleich zum Vp447 auf IFN α -behandelten Zellen kaum in der Lage war, sich auszubreiten. Nach 48h konnten, im Gegensatz zum Vp447, keine größeren infizierten Foci nachgewiesen werden. Meist fanden sich nur 1-3 infizierte Zellen pro Focus. Hierdurch wurde die Hypothese der verminderten Ausbreitungsfähigkeit des VpCR85 gestützt.

3.4.2 Empfänglichkeit von verschiedenen porcinen Zelllinien für das VpCR85 nach IFN α -Behandlung

Die in Abschnitt 3.4.1 dargestellten Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass die Verminderung der Titer des VpCR85 bei IFN α -Behandlung der Zellen vor allem durch eine starke Reduktion der Virusausbreitung hervorgerufen wurde. Um zu testen, ob die Fähigkeit des VpCR85 zur Etablierung einer Infektion herabgesetzt ist, wurden PK15-, SK6- und STE-Zellen auf ihre Empfänglichkeit für das VpCR85 bei IFN α -Gabe (600IU/ml) 16h vor Infektion untersucht (Abb. 37). Die Empfänglichkeit wurde als prozentualer Anteil der infizierten, IFN α -behandelten Zellen an infizierten, unbehandelten Zellen (=100%) der gleichen Zelllinie bestimmt. Die Fixierung der Zellen sowie die Darstellung der infizierten Zellen erfolgte 24h nach der Infektion mittels immunhistochemischem Nachweis des viralen E2-Antigens. Um eine Virusausbreitung im Zellkulturmedium zu verhindern wurde 4h nach der Infektion das Medium abgenommen und durch Medium, das 1% Methylcellulose (MC) enthielt, ersetzt.

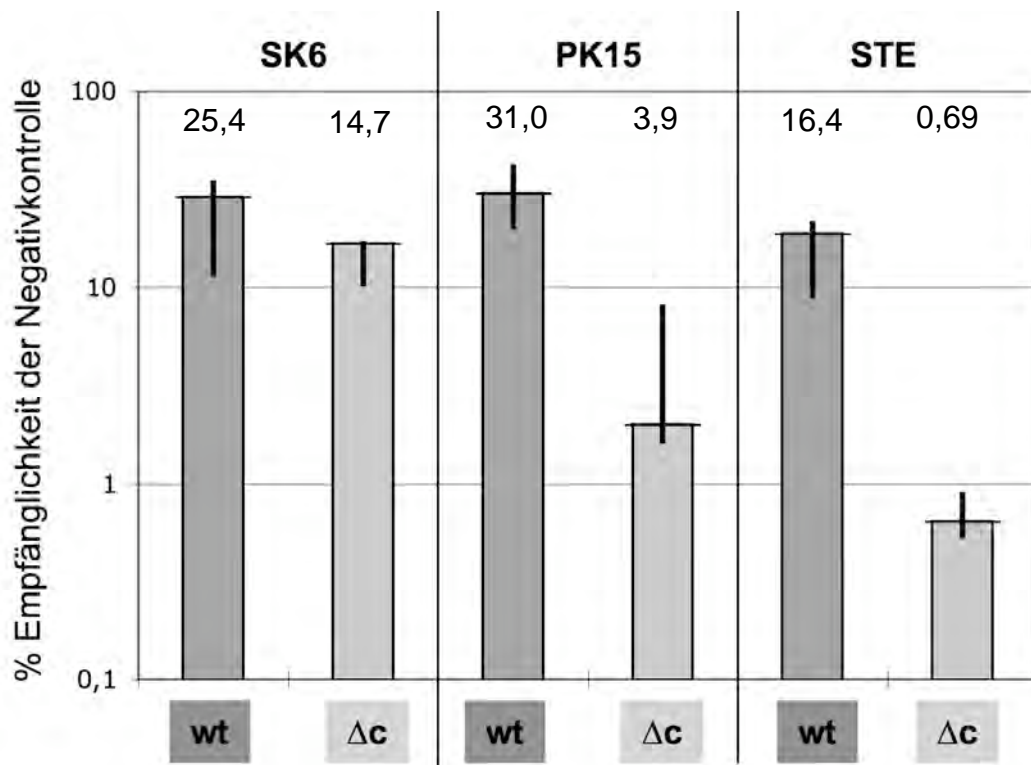


Abb. 37 : Bestimmung der prozentualen Empfänglichkeit von SK6-, PK15- und STE-Zellen bei IFN α -Behandlung 16h vor Infektion mit Vp447 oder VpCR85 im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Negativkontrolle). Dargestellt sind Median, Maximum und Minimum aus 6 unabhängigen Versuchen. Das arithmetische Mittel steht über der jeweiligen Werte-Säule. wt = Vp447; Δc = VpCR85.

Die Empfänglichkeit der 16h vor Infektion mit $\text{IFN}\alpha$ behandelten Zellen war für das VpCR85 immer geringer als für das Vp447. Jedoch zeigten sich zwischen den Zelllinien starke Unterschiede im Abfall der Empfänglichkeit. Für SK6-Zellen war die Abnahme der Empfänglichkeit für das VpCR85 im Vergleich zum Vp447 nur gering (< 2), wohingegen für PK15- und vor allem für STE-Zellen eine sehr starke Abnahme der Empfänglichkeit (8- bzw. 24-fach) gegenüber dem Vp447 nachgewiesen werden konnte.

Nun war es von Interesse genauer einzuschränken, ab welchem Zeitpunkt die $\text{IFN}\alpha$ -Behandlung der Zellen zu dem in Abb. 37 gezeigten Empfänglichkeitsverlust für das VpCR85 führt. Für STE- und PK-15 Zellen war eine zeitliche Festlegung des Phänomens möglich (Abb. 38 und 39). Während die $\text{IFN}\alpha$ -Behandlung zum Zeitpunkt der Infektion kaum Auswirkungen auf die Differenz der Empfänglichkeit für das VpCR85 im Vergleich zum Vp447 hatte, war bei der $\text{IFN}\alpha$ -Gabe 4h vor der Infektion eine deutliche Abnahme der Empfänglichkeit für das VpCR85 im Vergleich zum Vp447 nachweisbar.

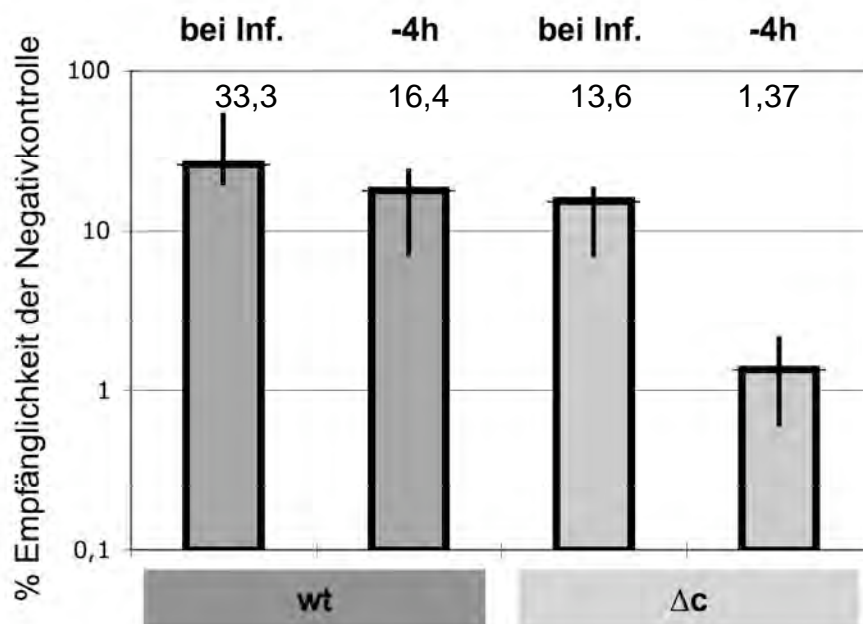


Abb. 38 : Prozentuale Empfänglichkeit von STE-Zellen bei $\text{IFN}\alpha$ -Behandlung zum Zeitpunkt der Infektion oder 4h vor der Infektion (-4h) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) für das Vp447 und VpCR85. Dargestellt sind Median, Maximum und Minimum aus 3 unabhängigen Versuchen. Das arithmetische Mittel steht über der jeweiligen Werte-Säule. wt = Vp447; Δc = VpCR85.

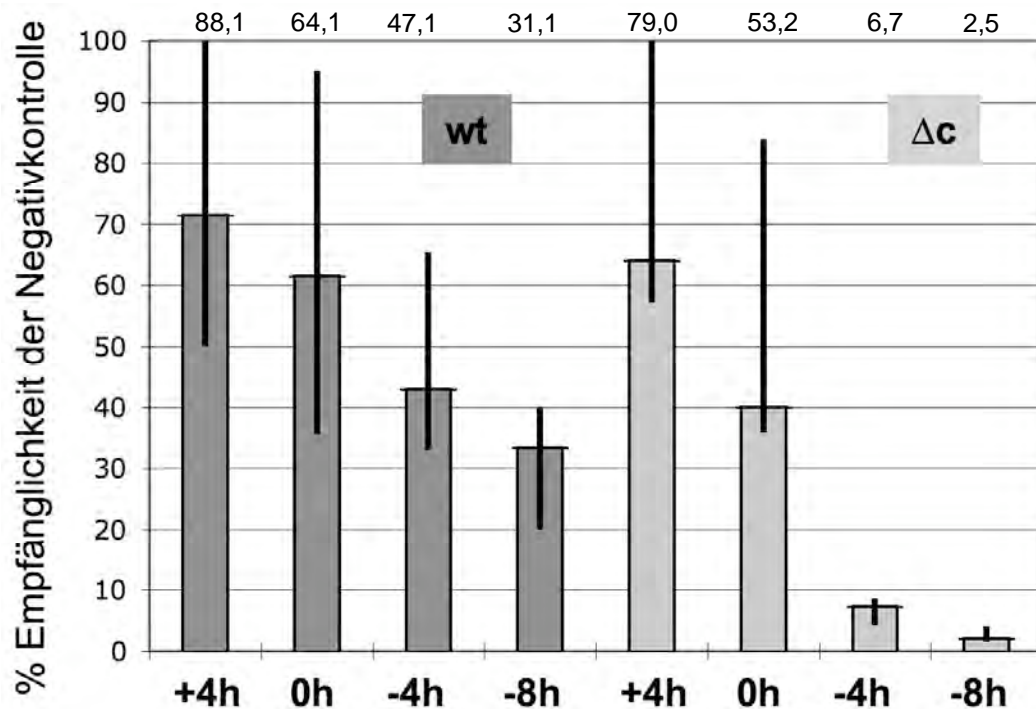


Abb. 39 : Prozentuale Empfänglichkeit von PK15-Zellen für das Vp447 und VpCR85 bei Behandlung mit IFN α 8h (-8h) und 4h (-4h) vor Infektion, bei Infektion (0h), und 4h nach Infektion (+4h) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Negativkontrolle). Dargestellt sind Median, Maximum und Minimum aus 3 unabhängigen Versuchen. Das arithmetische Mittel ist über der jeweiligen Werte-Säule angegeben. wt = Vp447; Δc = VpCR85.

Um bestimmen zu können nach welchem Zeitraum IFN α -induzierte Genprodukte in STE-Zellen nachweisbar sind, wurde IFN α (600IU/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Zelllysis zu den Zellen gegeben. Nach der Zelllysis wurde das MxA-Protein mittels Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 40). Hierbei zeigte sich, dass das MxA-Protein schon 4h nach der IFN α -Gabe in den Zellen detektierbar war und die nachweisbare Menge bis etwa 10h nach der IFN α -Gabe anstieg. Somit deckte sich der Wert des frühestmöglichen MxA-Nachweises mit der Reduktion der Empfänglichkeit für das VpCR85.

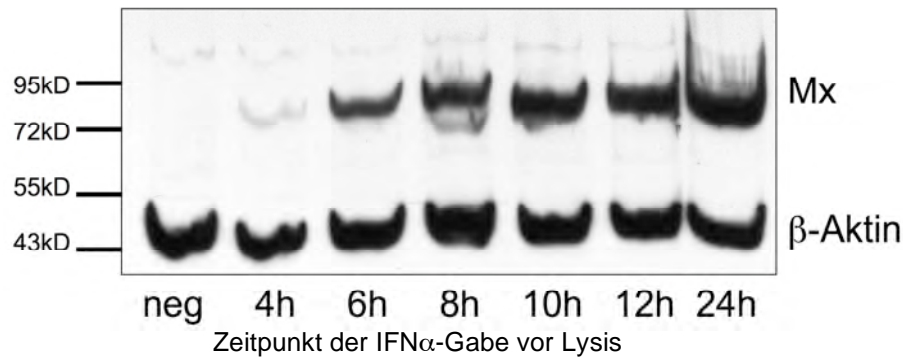


Abb. 40 : Nachweis des MxA-Proteins in Lysaten von STE-Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Lysis mit 600iU IFN α behandelt wurden. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde ein anti- β -Aktin mAk verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10% Polyacrylamid-Gel.

3.4.3 Bestimmung der RNS-Infektiosität

Durch die Einschränkung des Zeitfensters für die Inhibition der Infektion mit dem VpCR85 nach IFN α -Behandlung war es auch möglich, die Schritte des viralen Lebenszyklus, in denen die Inhibition ihre Wirkung entfalten sollte, einzuschränken. Um weitere Informationen über den Mechanismus der zellulären Resistenzsteigerung gegenüber dem VpCR85 zu gewinnen, wurde als nächstes die RNS-Infektiosität bestimmt. Sie gibt an, wieviel virale genomische RNS zur erfolgreichen Transfektion einer Zelle benötigt wird. Hierzu wurden SK6- und PK15-Zellen mit standardisierten Mengen viraler RNS des VpCR85 oder Vp447 transfiziert. Um infizierte Einzelzellen nach immunhistochemischer Detektion des viralen E2-Antigens auszählen zu können, wurde die RNS-Menge (in μ g) variiert und die Zellen in Zehnerschritten verdünnt. Ein Teil der PK15-Zellen wurde 16h vor der Infektion mit 600iU IFN α / ml Medium behandelt (Abb. 41).

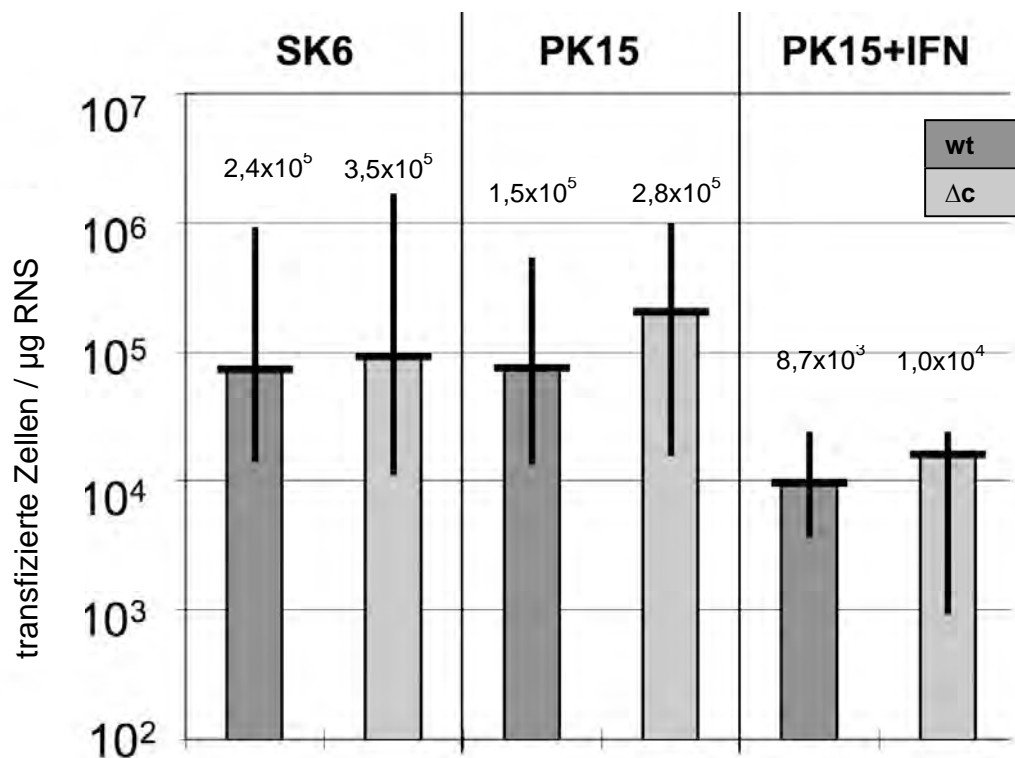


Abb. 41 : RNS-Infektiosität von Transkripten des p447 und pCR85 in SK6-, PK15- und IFN α -behandelten PK15-Zellen. Bestimmt wurde die Anzahl virales E2 exprimierender Zellen bei unterschiedlichen RNS-Mengen in n=3 unabhängigen Versuchen. Aufgetragen sind Median, Maximum und Minimum. Das arithmetische Mittel steht über der jeweiligen Werte-Säule. wt = Vp447; Δc = VpCR85.

Es konnten keine wesentlichen Unterschiede der RNS-Infektiosität zwischen genomischer RNS des Vp447 und VpCR85 festgestellt werden. Beiden viralen Genomen war ein etwa zehnfacher Verlust der RNS-Infektiosität bei IFN α -Vorbehandlung der PK15-Zellen gemein, was dafür spricht, dass die Abnahme der RNS-Infektiosität unabhängig davon ist, ob das virale Genom für Core kodiert oder nicht. Die starke Variation innerhalb der Ergebnisse lässt sich auf Unterschiede zwischen den verwendeten Zellen, der verwendeten RNS und Varianz bei der Elektroporation zurückführen.

Erfolgreich transfizierte Zellen konnten für genomische RNS des Vp447 und VpCR85 noch bei Verwendung von 1×10^{-5} µg RNS / Elektroporation nachgewiesen werden. Bei IFN α -Behandlung der PK15-Zellen war dies nur bis zu 1×10^{-3} µg RNS / Elektroporation möglich. Wiederum war kein deutlicher Unterschied zwischen Vp447 und VpCR85 erkennbar. Das Fehlen der Core-kodierenden Region hat daher offensichtlich keine Auswirkung auf die Infektiosität der RNS.

3.4.4 Steigerung der Empfänglichkeit IFN α vorbehandelter, porziner Zelllinien für das VpCR85 durch Transkomplementierung von Core

Als nächstes sollte untersucht werden, wie sich die Transkomplementierung von Core auf die Empfänglichkeit porziner Zelllinien für das VpCR85 auswirkt. Die Transkomplementierung kann zum einen in der zu infizierenden Zelle, zum anderen in der Virus-produzierenden Zelle erfolgen, womit eine Integration des Core-Proteins in das Viruspartikel erreicht werden soll. Bei der Expression von Core in den zu infizierenden Zellen (PK15 tet on) konnte keine Verbesserung der Empfänglichkeit für das VpCR85 beobachtet werden.

Daher wurden Vp447 und VpCR85 auf Core-exprimierenden SK6-Zellen angezogen. Zunächst wurden die Viruspartikel auf Integration des Core-Proteins in der Western Blot Analyse überprüft (Abb. 42).

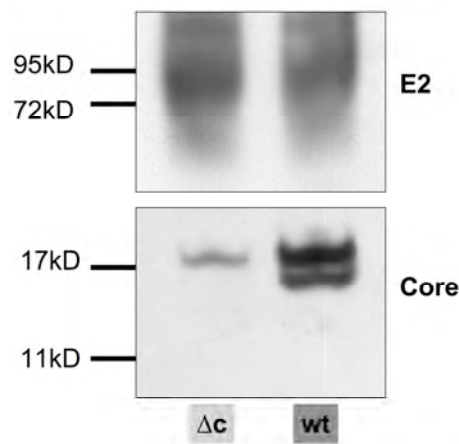


Abb. 42 : Western Blot Analyse des E2- und Core-Protein-Gehalts von Partikeln des VpCR85 und Vp447 im Überstand Core-exprimierender SK6-Zellen 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS. Die Detektion des E2-Glykoproteins erfolgte mit dem mAk A18, die des Core-Proteins mit dem mAk 5H4. Die Auftrennung der Proteine wurde in einem 10% Polyacrylamid-Gel durchgeführt. wt = Vp447; Δc = VpCR85.

Hierbei fiel auf, dass für das VpCR85 im Vergleich zum Vp447 deutlich weniger Core-Protein im Verhältnis zum E2-Glykoprotein in angereicherten Viruspartikeln nachweisbar war. Dies wird auf eine die Inkorporation des Core-Proteins inhibierende Wirkung der kompensierenden Mutation im NS3-Protein zurückgeführt (Rümenapf, personal communication). In den angereicherten Partikeln des Vp447 war eine zusätzliche Bande bei etwa 15kD in der Western Blot Analyse des Core-Proteins nachweisbar. Sie repräsentiert wahrscheinlich auf Grund der zellulären

Überexpression schon teilweise abgebautes oder nicht vollständig translatiertes Core-Protein.

Core-Deletionsmutanten des KSPV sind bei Transkomplementierung von Core in der Lage, infektiöse Partikel zu bilden (vgl. Kap. 3.1.3). Diese Viren kodieren für keine Mutation in der NS3-Helikasedomäne, die die Core-Inkorporation in den Partikel hemmen sollte. Daher wurde ein pCR85 ohne kompensatorische Mutation im NS3 generiert (pCR173, $\Delta c^{\Delta Mut}$), um auch einen Core-Deletions-KSPV mit dem Vp447 vergleichbarem Partikel-Core-Gehalt testen zu können (Abb. 43).

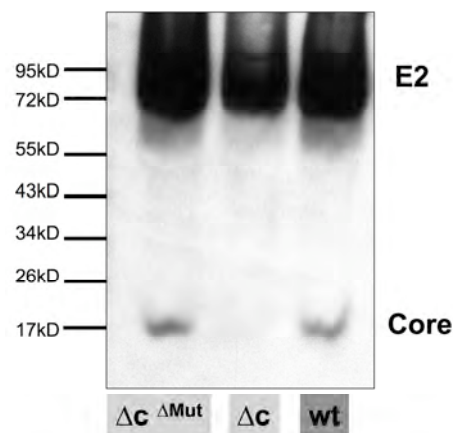


Abb. 43 : Western Blot Analyse des Core-Protein-Gehalts angereicherter Partikel des VpCR173, VpCR85 und Vp447 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in Core-exprimierende SK6-Zellen. Die Detektion des E2-Glykoproteins erfolgte mit dem mAk A18, die des Core-Proteins mit dem mAk 5H4. Die Auftrennung der Proteine wurde in einem 10% Polyacrylamid-Gel durchgeführt. wt = Vp447; Δc = VpCR85; $\Delta c^{\Delta Mut}$ = VpCR173.

In Core-exprimierenden SK6-Zellen wuchs das VpCR173 mit vergleichbaren Titern wie das VpCR85. Daraufhin wurde die Empfänglichkeit von PK15- und STE-Zellen, die 16h vor der Infektion mit IFN α (600IU) behandelt wurden, für diese Viren getestet (Abb. 44).

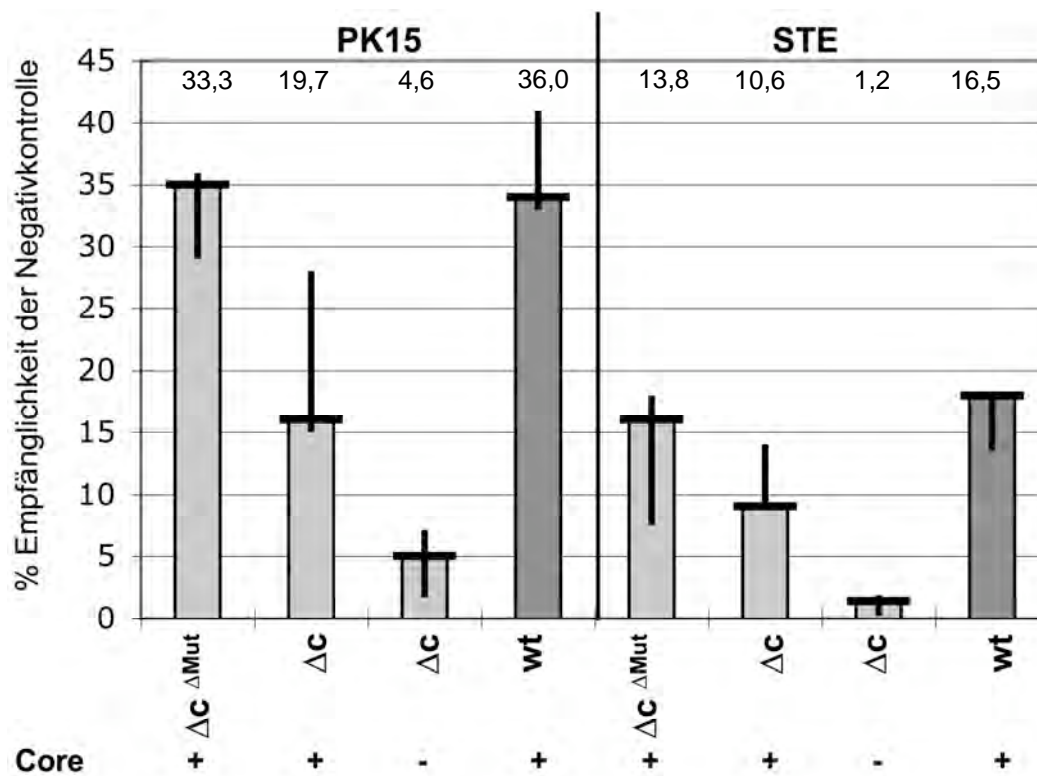


Abb. 44 : Empfänglichkeit von IFN α vorbehandelten PK15- und STE-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen in % für mit Core transkomplementiertes VpCR173, VpCR85 und Vp447 (Core +) sowie für nicht transkomplementiertes VpCR85 (Core -). Die IFN α -Gabe erfolgte 16h vor Infektion. Dargestellt sind Median, Maximum und Minimum aus 3 unabhängigen Versuchen. Das arithmetische Mittel steht über der jeweiligen Werte-Säule. wt = Vp447; Δc = VpCR85; $\Delta c^{\Delta Mut}$ = VpCR173.

Durch die Produktion des VpCR85 auf Core-exprimierenden SK6-Zellen konnte die Empfänglichkeit von IFN α -vorbehandelten PK15- und STE-Zellen um das Vier- bzw. Neunfache gesteigert werden. Für das besser komplementierende VpCR173 zeigten die Zellen eine noch deutlichere Steigerung der Empfänglichkeit. Sie belief sich für PK15-Zellen auf das Siebenfache, für STE-Zellen auf das Elffache. Damit wiesen beide Zelllinien bei IFN α -Vorbehandlung eine dem Vp447 vergleichbare Empfänglichkeit für mit Core transkomplementierte Partikel des VpCR173 auf.

4. Diskussion

Das pestivirale Core-Protein nimmt auf Grund seiner Kürze und Strukturierung eine Sonderstellung in der Familie der *Flaviviridae* ein. Untersuchungen zur Konformation des BVDV Core-Proteins ergaben, dass das Protein intrinsisch ungeordnet ist. Nur die letzten 15 C-terminalen AS (241-255) nehmen als Bestandteil des Signalpeptids eine alpha-helikale Konformation ein (Ivanyi-Nagy et al., 2008; Murray et al., 2008). Im Gegensatz hierzu wird das Core-Protein der Flavi- und Hepaciviren als dimere, alpha-helikale Struktur beschrieben (Jones, 2003; Boulant et al., 2005), wobei unstrukturierte Bereiche des Protein N-Terminus für die RNS-Bindung verantwortlich sind (Fan et al., 1999). Der C-Terminus des HCV Core-Proteins hingegen vermittelt durch seine Hydrophobizität die Assoziation mit der ER-Membran (Boulant et al., 2006).

Funktionelle Untersuchungen der Interaktion des BVDV Core-Proteins mit Nukleinsäuren beschreiben es als ein unspezifisch, mit geringer Sensitivität RNS bindendes Protein, das RNS-Chaperon-Aktivität besitzt (Ivanyi-Nagy et al., 2008; Murray et al., 2008). Die stark positive Ladung des Proteins soll für die Funktionalität ausschlaggebend sein. Bisher fehlen Untersuchungen zur Bestimmung von essentiellen Domänen im Core-Protein der Pestiviren und zu von der Partikelbildung unabhängigen Core-Funktionen. Zudem bleibt die Frage zu klären, welche Struktur das pestivirale Nukleokapsid aufweist.

4.1 Bestimmung von essentiellen Domänen im Core-Protein des Vp447

Reimann et al. (2007) konnten durch die Generation eines BVDV (NCP-7) mit Deletion der Core-AS 201-242 (Angabe als Position im Polyprotein) zeigen, dass das Core-Protein ein essentieller Faktor für die Bildung pestiviraler Partikel ist. Durch zelluläre Transkomplementation des Core-Proteins konnte die fehlende Funktionalität des viralen Core-Proteins jedoch ausgeglichen werden, so dass es wieder zur Bildung von Viruspartikeln kam.

Der Sequenzvergleich der Core-Proteine verschiedener Pestivirusspezies (Abb. 45) zeigt, dass das N-terminale Drittel des Proteins (AS Position 169-200 des

Polyproteins) variabel ist (36% Sequenzidentität). Jedoch findet sich ein weitgehend konstantes Verhältnis von basischen (10-11) zu sauren AS (7-9). Die C-terminalen zwei Drittel des Proteins sind mit 66% Sequenzidentität hingegen stärker konserviert und weisen eine vergleichbare Verteilung von geladenen und ungeladenen Abschnitten auf.

		170	180		190		200		210
CSFV_Alfort		SDDGASG-SKDKK	--PDRMNKGKLIKIA	PREHEK	DSKTKPPDA	TIVVEG			
BDV_X818		SDDNKSEKTNKK	--PDRVRRGAMKITP	KESK	DSRSKPPDA	TIVVEG			
BVDV1_NCP7		SDTKDEGVVRKKQ	QKPDRL	EKG	RMKITP	KESK	DSKTKPPDA	TIVVDG	
BVDV2_XJ04		SDEGGKGATSKKQ	PKPDRI	EKG	KMRIAP	KETE	CKTRPPDA	TIVVEG	
Bungowannah		SDDKGAKPKVKPK	--DDRMKQ	GKIVTKP	KETE	EADQKTRPPDA	TIVVDG		
		**	**	*	*	*	*	*	*

		220	230		240		250
CSFV_Alfort	VKYQI	KKKGKVGKNTQ	DDGLYHNKN	KPPE	SRKKLEKALLA	WA	
BDV_X818	IKYQV	KKKGKVGKNTQ	DDGLYHNKN	KPPE	SRKKLEKALLA	WA	
BVDV1_NCP7	VKYQV	KKKGKVKSKNTQ	DDGLYHNKN	KPQ	SRKKLEKALLA	WA	
BVDV2_XJ04	VKYQV	KKKGKVRKKNTQ	DDGLYHNKN	KPL	SRKKLEKALLA	WA	
Bungowannah	QKYQV	RKKGKAKPK-TQ	DDGLYHNKN	KPE	SRKKLEKALLA	WA	
	***	*****	*	*****	*****	*****	**

Abb. 45 : Vergleich der Core-Proteinsequenz verschiedener Pestiviruspezies (CSFV = Virus der klassischen Schweinepest; BDV = Border Disease Virus). Ausgewählte Deletionen im Core-Protein des Vp447 sind durch Kästchen hervorgehoben. Bei grauem Hintergrund beträgt der Titerabfall bei Deletion dieser Bereich im Vergleich zum Ausgangsvirus mehr als das Hundertfache. Die Zahlen über der Sequenz geben die Aminosäureposition im CSFV Alfort Polyprotein wieder. Homologe Aminosäuren sind durch einen Stern gekennzeichnet. Saure Aminosäuren sind fett gedruckt, basische Aminosäuren unterstrichen. Gene Bank Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen: CSFV_Alfort U90951.1v; BDV_x818 AF037405.1; BVDV2_XJ04 FJ527854.1; Bungowannah EF100713.1.

Verkürzungen des KSPV Core-Protein N-Terminus wurden bis zu Aminosäureposition 178 des Vp447 Polyproteins ohne starken Abfall des viralen Wachstums toleriert. Hingegen kam es bei Verkürzung des Core N-Terminus bis einschließlich AS 180 des Polyproteins zu einer dramatischen Verminderung der Virusbildung. Da es sich bei den AS an Position 179 und 180 um Lysine handelt, lag die Vermutung nahe dass deren positive Ladung für die Funktionalität des Vp447 Core-Proteins wichtig ist. Um dies zu überprüfen wurden die Lysine 179 und 180 durch ein Serin und ein Glycin ersetzt. Dies führte zu einer etwa zehnfachen Verbesserung der viralen Vermehrungsfähigkeit, die jedoch im Vergleich zum Wildtyp immer noch stark (mehr als 10.000-fach) vermindert war. Diese Ergebnisse zeigen, dass Modifikationen des Core N-Terminus bis zu AS Position 178 kaum Auswirkungen auf die Virusproduktion haben. Hingegen sind die basischen AS an Position 179 und 180 essentiell für die Funktion des Vp447 Core-Proteins.

In der N-terminalen Hälfte des Vp447 Core-Proteins fallen zwei gut konservierte Bereiche, AS 194-198 und AS 208-212, ins Auge. Die Core-Funktion soll vor allem durch seine positive Ladung vermittelt werden, weshalb die starke Konservierung dieser Bereiche auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung überrascht. Bei dem Abschnitt AS 194-198 handelt es sich um eine alternierende Abfolge von sauren und basischen AS, mit zentralem Histidin. Die Deletion dieses Abschnitts führte zu einem dramatischen Abfall der Virusproduktion. Für das Turnip Yellow Mosaik Virus wurde die Wichtigkeit von Abschnitten alternierender basischer und saurer AS, zusammen mit einzelnen Histidinen, beschrieben (Bink und Pley, 2002). Jedoch konnte für das Vp447 bei Mutagenese der Histidine des Core-Proteins kein starker Abfall der Virusproduktion beobachtet werden. Daher scheinen die Histidine des Core-Proteins keine wichtige Rolle bei der Partikelmorphogenese zu spielen.

Der Bereich AS 208-212 des Vp447 Polyproteins wurde von Mandl et al. (1988) auf Grund von Sequenzvergleichen als homologe Region zu der internen hydrophoben Domänen des Core-Proteins der Flaviviren beschrieben. Die Deletion dieses AS-Abschnitts im Vp447 führte zu einem starken Abfall der Virusproduktion. Da diese AS-Abfolge im Sequenzmotiv DATIVV in allen bekannten Pestivirusspezies konserviert ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein funktionell wichtiges Element des pestiviralen Core-Proteins handelt. Die leichte Hydrophobizität dieser AS-Abfolge könnte auf eine Rolle als Interaktionselement mit anderen Proteinen oder Core selbst hindeuten. Für eine Funktion als Membrananker in Analogie zum Core-Protein der Flaviviren erscheint die Hydrophobizität dieses Abschnitts nicht ausreichend.

Große Bereiche vorwiegend basischer AS (AS 213-231) konnten in der C-terminalen Hälfte des Vp447 Core-Proteins deletiert werden, ohne einen mehr als 30-fachen Abfall der Virusproduktion zu bewirken. Diese Ergebnisse widersprechen der bisherigen Meinung, dass die Funktion des pestiviralen Core-Proteins vor allem von seiner positiven Gesamtladung abhängt. Es scheint vielmehr die Anordnung gewisser konservierter Domänen für die Virusbildung ausschlaggebend zu sein.

Die Untersuchung der Auswirkung von C-terminalen Verkürzungen auf die Core-Funktion konnte nicht durch Deletion der entsprechenden AS im Virusgenom erfolgen, da eine Unterscheidung zwischen Funktionsverlust des Core-Proteins und des Signalpeptids nicht möglich wäre. Um dieses Problem zu umgehen wurden

Zelllinien generiert, die verschiedene C-terminale Verkürzungen des Vp447 Core-Proteins induzierbar exprimieren. Als Indikator für die Funktionalität dieser Core-Verkürzungen im Bezug auf die Virusproduktion diente ein Vp447 mit nahezu kompletter Deletion des Core-Proteins (AS 170-246, Vp619). Das Vp619 ist nicht in der Lage, ohne Bereitstellung von Core Viruspartikel zu bilden. Hierbei zeigte sich, dass schon Verkürzungen von ein oder zwei AS am C-Terminus des maturen Core-Proteins ausreichen, um eine deutliche Reduktion der Virusproduktion durch das Vp619 zu bewirken. Dies bestätigte vorhergehende Arbeiten, die den Core C-Terminus des Vp447 auf AS 255 des Polyproteins festlegen und die Wichtigkeit eines Tryptophans in diesem Bereich betonen (Heimann et al., 2006). Die Bildung von geringen Mengen an infektiösen Partikeln war bis zur Expression von Core 243 nachweisbar, jedoch nicht mehr für Core 237. Durch dieses Experiment konnte der authentische C-Terminus des Vp447 Core-Proteins bestätigt und Core 243 als kleinstes funktionelles Core bei C-terminaler Verkürzung identifiziert werden.

4.2 Untersuchungen zur Plastizität des Core-Proteins

Die Morphologie des pestiviralen Partikels wurde, in Analogie zu anderen Mitgliedern der *Flaviviridae*, als glykoproteintragende Hülle beschrieben, die ein ikosahedrales Nukleokapsid enthält. Cryoelektronenmikroskopische Studien an Partikeln von Flaviviren und HCV zeigten, dass die innere Struktur des Viruspartikels ungeordneter erscheint als die ikosahedrale Anordnung der Glykoproteine in der Hülle (Kuhn et al., 2002; Yu et al., 2007). Daher wird mittlerweile für Flavi- und Hepaciviren angenommen, dass sie kein ikosahedrales Kapsid besitzen. Auch für Pestiviren existieren Hinweise, dass das Core-Protein keine Hülle um das virale Genom bildet, sondern histonartig mit diesem interagiert (Murray et al., 2008). Durch die relativ geringe Partikelausbeute (etwa 100 Viren/Zelle) und das Fehlen eines serumunabhängigen Zellkultursystems mit vergleichbarer Virusproduktion wie ein serumverwendendes System ist die Darstellung von pestiviralen Partikeln durch die Elektronenmikroskopie bislang unbefriedigend. Um genaueres über die mögliche Form des pestiviralen Nukleokapsids zu erfahren, sollte in den nachfolgenden Untersuchungen durch Amplifikation des Core-Protein-Gens und Insertion von

Fremdgenen in ein Core-Protein-Dimer die Toleranz des Vp447 auf eine Vergrößerung des Core-Proteins überprüft werden.

Für Vp447 mit einer Verdoppelung (Vp447_{CC}) oder Verdreifachung (Vp447_{CCC}) der Core-kodierenden Region waren Virusbildung und Integration des stark vergrößerten Core-Moleküls in die Viruspartikel nachweisbar. Im Hinblick auf die Wachstumeigenschaften und den Core-Protein Gehalt der Virionen zeigte sich ein deutlicher Vorteil des Vp447_{CC} gegenüber dem Vp447_{CCC}. Es ließen sich 24h nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS in SK6-Zellen 20% (Vp447_{CC}) bzw. 2% (Vp447_{CCC}) des entsprechenden Wildtypiters nachweisen. Dies unterstützt vor allem die Vermutung, dass das Core-Protein im Viruspartikel als Dimer vorliegt (Roman-Sosa, unpublished). Jedoch zeigen diese Ergebnisse sehr deutlich, dass der pestivirale Partikel auch bei starker Vergrößerung und gleichzeitiger Massenzunahme des Core-Proteins gebildet werden kann. Hieraus ergibt sich die Frage, ob Pestiviren überhaupt ein ikosahedrales Nukleokapsid besitzen, da eine Vergrößerung des Core-Proteins starke Auswirkungen auf den Aufbau der equivalenten asymmetrischen Untereinheit, und somit auf die Größe des Kapsids, haben sollte.

Die Integration von ein bis drei YFP-Molekülen zwischen zwei Core-Proteine (Vp447_{cYc}, Vp447_{cYYc}, Vp447_{cYYYc}) im Vp447 diente der Untersuchung der maximal tolerierten Core-Größe im Bezug auf Partikelintegration und Virusbildung. Ausserdem sollte überprüft werden, ob mit diesen Konstrukten eine Expression von Fremdgenen, bei Integration derselben in das Virus, möglich ist. Für alle Core-YFP_n-Core (n=1-3) kodierenden Plasmide konnte nach Transfektion der entsprechenden genomischen RNS die Bildung infektiöser Partikel sowie Integration der modifizierten Core-Proteine in eben diese nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich für diese Konstrukte ein verlangsamtes Wachstum nach Transfektion der genomischen RNS, was zu einer Abflachung der viralen Wachstumskurve führte. Dies ist wahrscheinlich auf die nicht unerhebliche Vergrößerung des viralen Genoms (etwa 800bp / YFP-Gen) durch die Insertion der YFP-Sequenzen zurückzuführen. Beim Nachweis der modifizierten Core-Proteine im Viruspartikel fiel ein schwaches Signal in der Western Blot Analyse auf, was durch ein geringes Vorkommen der modifizierten Core-Proteine im Partikel oder durch die verminderte Partikelproduktion insgesamt erklärt werden kann. Unabhängig davon stellen diese Konstrukte eine Möglichkeit zur Integration von Fremdgenen in den pestiviralen Partikel dar. Sie liefern zusätzliche

Evidenz, die gegen das Vorhandensein eines ikosahedralen Nukleokapsids bei Pestiviren sprechen und unterstützen Hinweise auf eine histonartige Interaktion des pestiviralen Core-Proteins mit dem viralen Genom (Murray et al., 2008).

Um die Auswirkungen einer gestörten räumlichen Integrität des Core-Proteins auf das Wachstum des Vp447_{cYc} zu untersuchen, wurden Verkürzungen des N-terminalen Core-Proteins an dessen C-Terminus sowie des C-terminalen Core-Proteins an dessen N-Terminus sowie Kombinationen der Verkürzungen des C- und N-terminalen Core-Proteins generiert. Deletionen von mehr als 63 AS als Kombination von Verkürzungen am N- und C-terminalen Core-Protein führten zum Verlust der Fähigkeit, infektiöse Partikel zu bilden, ohne die Replikation zu beeinflussen. Die Virusproduktion war umgekehrt proportional zur Größe der eingefügten Deletion. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Kompensation von Funktionsverlusten eines Core-Proteins durch Deletion bestimmter Abschnitte nicht durch deren Präsenz in einem räumlich getrennten Core-Protein stattfindet. Das C-terminale Core-Protein reagierte auf Verkürzungen geringgradig sensitiver als das N-terminale Core-Protein. Ursache hierfür könnte die räumliche Nähe zum Signalpeptid oder die Lokalisation der Verkürzungen (C- oder N-terminal) sein. Im Gegensatz zur kompletten Deletion des N-terminalen Core-Proteins wurde durch die Deletion des C-terminalen Core-Proteins die Bildung infektiöser Partikel unterbunden. Dies unterstreicht seine Bedeutung für die Lebensfähigkeit des Virus und legt nahe, dass die Fusion von Proteinen an das Core-Protein stark negative Auswirkungen auf die Partikelbildung hat.

Für die langfristige Vermehrung eines veränderten Virus in Zellkultur ist die genetische Stabilität von außerordentlicher Bedeutung. Das Vorhandensein homologer Sequenzen in rekombinanten Vp447, die für Core-Amplifikationen kodieren, beinhaltet daher ein erhöhtes Risiko der Rekombination des viralen Genoms während der Replikation. Das Vp447_{CC}, Vp447_{CCC}, Vp447_{BVDVcYc} und Vp447_{c20Yc23} zeigten alle eine Reversion des viralen Genoms zur ursprünglichen Core-Sequenz des Vp447 nach drei bis vier Passagen, vermutlich durch homologe Rekombination. Im Falle des Vp447_{BVDVcYc} kam es jedoch zu einem Verlust von sechs Aminosäuren (171-176 des Vp447 Polyproteins) am N-Terminus des Core-Proteins, ausgelöst durch die Heterologie der beiden Core-Sequenzen in diesem

Bereich. Wie unter 4.1 beschrieben hat diese Verkürzung jedoch kaum Auswirkungen auf die Vermehrungsfähigkeit des Virus.

Genetisch stabil zeigte sich die YFP-Core-kodierende Region des Vp447_{YC}. Auch nach mehreren Passagen konnten keine Sequenzveränderungen in diesem Bereich festgestellt werden. Trotzdem verbesserten sich die Wachstumseigenschaften des Virus während der Passagierung deutlich. Dies legte nahe, dass Veränderungen an anderer Stelle des viralen Genoms stattgefunden hatten. In der für NS3 kodierenden Region konnten verschiedene, zu Aminosäureveränderungen führende, Basenaustausche gefunden werden. Die Steigerung der Virusproduktion des Vp447_{YC} war durch den Austausch der NS3 kodierenden Region des nach zwei Passagen revertierten Vp447_{YC} in das originäre Vp447_{YC} reproduzierbar. Offensichtlich können Mutationen in der Helikasedomäne des NS3 die Virusproduktion bei funktionellen Defekten des Core-Proteins deutlich verbessern. Durch den Austausch der AS 2256 von Asparagin zu Tyrosin wurde das Vp447_{YC} gleichermaßen in seinen Wachstumseigenschaften verbessert. Somit kann ein Mangel an Core-Funktion, der wahrscheinlich in der Verpackung der genomischen RNS in den Partikel begründet liegt, durch einen Aminosäureaustausch an einem Nichtstrukturprotein kompensiert werden. Die Integration des Core-Proteins in den viralen Partikel war trotz vorhandener Mutation in der NS3-Region möglich. Für Flaviviren und Hepaciviren existieren verschiedene Berichte über die Rolle von Nichtstrukturproteinen, im speziellen NS3, in der Partikelbildung (Ma et al., 2008; Patkar et al., 2008). Für das Yellow Fever Virus (YFV) konnte gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch in der NS3-Helikase Domäne die Bildung infektiöser Partikel verhindern konnte, ohne dabei die Replikation zu beeinflussen (Patkar et al., 2008). Für das HCV wurde eine Mutation im NS3 beschrieben, die zur Rettung subvitaler viraler Genome führt. Sie ist jedoch in Domäne 1 des NS3 zu finden (Ma et al., 2008). Durch den Nachweis einer kompensatorischen Mutation in der NS3-Helikasedomäne bei funktionell eingeschränktem Core-Protein kann nun auch für Pestiviren eine direkte Rolle des NS3-Proteins in der Partikelbildung angenommen werden.

4.3 Untersuchung von Core-Funktionen durch phänotypische Charakterisierung eines Vp447 mit deletiertem Core-Gen

Die Generierung eines lebensfähigen Vp447 mit fast vollständig deletiertem Core-Gen gelang durch die Erkenntnis, dass einzelne Aminosäureveränderungen in der NS3-Helikasedomäne Funktionsverluste des Core-Proteins kompensieren können (Vp1017 = Vp447 Δ 170-246 N2177Y). Dies wurde von Rümenapf und Heimann zuerst durch die Rettung eines Vp447 mit defekter SPP-Spaltstelle gezeigt. Bislang konnte nicht aufgeklärt werden, wie dieser Aminosäureaustausch in der NS3-Helikasedomäne den Verlust des Core-Proteins, und damit auch seiner Funktionen, ausgleichen kann. Außerdem impliziert die Tatsache, dass ein komplettes virales Strukturprotein durch einen Aminosäureaustausch in einem Nichtstrukturprotein ersetzt werden kann, zusammen mit der Existenz apathogener Mitglieder der *Flaviviridae*, die für kein Core-Protein kodieren (GBV-A und -C) (Leary et al., 1996; Linnen et al., 1996), die Frage nach weiteren Funktionen des Core-Proteins.

Experimente zum Wachstum des Vp1017 auf porzinen Zelllinien (PK15-, SK6-, STE-Zellen) zeigten eine 10-100-fache Reduktion der Partikelproduktion im Vergleich zum Vp447. Die Viabilität in diesen Zelllinien wurde durch mehrfache Passagierung bestätigt. In vivo war das Vp1017 hingegen nicht lebensfähig. Es konnte kein Virus im Serum infizierter Tiere nachgewiesen werden und die Tiere zeigten keine Krankheitssymptome. Eine Induktion von protektiven Antikörpern sowie ein vollständiger Schutz gegenüber Infektion mit homologen Vp447 waren jedoch nachweisbar.

Um zu untersuchen worauf das unterschiedliche Verhalten des Vp1017 in vivo und in vitro beruhte, wurden Versuche mit primären porzinen Endothelzellen und Makrophagen, die als Bindeglied zwischen Tier und Zelllinie dienen sollten, durchgeführt. Primäre porzine Endothelien erlauben die Etablierung einer persistierenden Infektion durch das KSPV (Bensaude et al., 2004) und sind auf Grund der durch die KSPV ausgelösten hämorrhagischen Symptome als Zytokinproduzenten von Interesse. Porzine Makrophagen wurden zur Charakterisierung von N^{pro}-Deletionsmutanten des KSPV (Δ N^{pro}KSPV) verwendet (Ruggli et al., 2003) und werden als Zielzellen des KSPV im Tier angesehen.

Das Wachstum des Vp1017 war sowohl in Endothelien als auch in Makrophagen im Vergleich zum Vp447 stark vermindert (≥ 200 -fach 24h nach Infektion, ≥ 2000 -fach 48h nach Infektion). Diese Zellen eliminierten das Vp1017 innerhalb weniger Tage, ließen aber eine Ausbreitung des Vp447 zu. Es fiel eine starke Zunahme apoptotisch veränderter Zellen und toter Zellen nach Infektion mit dem Vp1017 auf. Zudem waren die primären Zellen im Vergleich zum Vp447 um mehr als das 40-fache weniger empfänglich für das Vp1017.

Dieser starke Verlust an Vermehrungsfähigkeit im Vergleich zum Vp447 auf primären Zellen bestätigte zunächst die Ergebnisse des Tierversuches. Es stellte sich daher die Frage nach der Ursache für diesen Viabilitätsverlust in und ex vivo. Der starke Kontrast im Wachstum des Vp1017 zwischen porzinen Zelllinien und primären porzinen Zellen ließ zwei ursächliche Möglichkeiten zu. Entweder exprimieren porzine Zelllinien Faktoren, die das Wachstum des Vp1017 fördern, oder primäre porzine Zellen exprimieren Faktoren, die das Wachstum des Vp1017 hemmen. Zelllinien sind auf Grund ihrer Gewinnung aus Tumoren oder durch Transduktion mit Onkogenen in ihren Eigenschaften Körperzellen nicht gleichzustellen. Als Folge ihrer deregulierten Teilungsfähigkeit und erhöhter Resistenz gegenüber biotechnologischer Manipulation (z.B. Transfektion von DNS oder RNS) bestehen häufig Defekte im Bereich der Zellzyklus- und Apoptoseregulation sowie des angeborenen Immunsystems. Daher war es naheliegend, als Ursache für den Verlust der Vermehrungsfähigkeit des Vp1017 in vivo und in primären Zellen Faktoren des angeborenen Immunsystems zu vermuten. Mit dem angeborenen Immunsystem steht Zellen ein komplexes Arsenal an Effektoren, Regulatoren und Sensoren von viralen und bakteriellen Infektionen zur Verfügung. Eine Beeinträchtigung dieses Systems führt zu einer Verminderung der Resistenz gegenüber Pathogenen und kann somit auch die Vermehrung von Viren mit reduzierter Viabilität erlauben. Als ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das IFN-System zur Bekämpfung viraler Infektionen von besonderem Interesse.

Um eine mögliche Aktivierung des IFN-Systems der primären Zellen nachzuweisen, wurden entsprechende Zelllysate auf Expression des MxA-Proteins untersucht. Bei MxA handelt es sich um ein streng IFN-Promoter reguliertes Gen (ISG-3), daher kann es als Marker der Aktivierung des IFN-Systems verwendet werden (Haller et al., 1980). In Endothelzellen und Makrophagen konnte die Expression vom MxA nachgewiesen werden. Somit wiesen beide Primärzelltypen zum Zeitpunkt der

Infektion ein aktiviertes IFN-System auf. Wodurch diese Aktivierung im Einzelnen ausgelöst wurde ist nicht bekannt.

Um abzuklären, ob ein aktiviertes IFN-System die Vermehrungsfähigkeit des Vp1017 negativ beeinflusst, wurden porcine Zelllinien (SK6-, PK15- und STE-Zellen) mit IFN α behandelt. Alle Zelllinien reagierten nach Gabe von IFN α mit einer Expression von MxA. Versuche zu viralem Wachstum und Empfänglichkeit der porcinen Zelllinien bei IFN α -Behandlung zeigten eine deutliche Verminderung beider Größen für das Vp1017, auch im Vergleich zum Vp447. Offensichtlich wirkte sich ein aktiviertes IFN-System negativ auf das Vp1017 aus. Es kam zu Hemmung von Replikation und Partikelproduktion des Virus und zur Herabsetzung der Empfänglichkeit der Zielzellen. Dies würde Schutzfunktionen des Core-Proteins vor den Effektoren des IFN-Systems während der Infektion der Zelle, der Replikation und der Partikelbildung implizieren.

Das für das Vp1017 beschriebene Verhalten auf primären Zellen und auf mit IFN α -behandelten porcinen Zelllinien ähnelte sehr stark dem bereits in der Literatur beschriebenen Phänotyp eines ΔN^{pro} KSPV (Tratschin et al., 1998; Ruggli et al., 2003). Diese Viren wachsen in Zellkultur leicht verzögert, sind in primären Zellen nicht lebensfähig, können in Zellkultur nicht persistieren und führen zur Apoptose der Wirtszelle. Um weitere Gemeinsamkeiten des Vp1017 und ΔN^{pro} KSPV zu finden, wurde ein Nachweis des MxA-Proteins an mit Vp1017 infizierten SK6-, PK15- und STE-Zellen durchgeführt. Tatsächlich zeigte sich, dass das Vp1017 bei Infektion von PK15- und STE-Zellen, im Gegensatz zum Vp447, zur Expression von MxA führte. Da Pestiviren durch den IRF-3 Antagonisten N^{pro} einen sehr potenten Schutz vor der Aktivierung des IFN-Systems durch intrazelluläre virale Replikationsprodukte und extrazelluläre dsRNS besitzen (Bauhofer et al., 2007), stellte sich die Frage, wodurch die Aktivierung des IFN-Systems im Vp1017 ausgelöst worden war. Da eine fehlende IRF-3-Funktion in der Zelle nur durch IRF-7 kompensiert werden kann, dieser Transkriptionsfaktor aber nur nach vorheriger Aktivierung des IFN-Systems oder in bestimmten Zelltypen (plasmazytoide dendritische Zellen) exprimiert wird (McCullough und Summerfield, 2009), erschien ein Funktionsverlust des N^{pro} im Vp1017, auch auf Grundlage der phänotypischen Ähnlichkeit mit einem ΔN^{pro} KSPV wahrscheinlich. Daher war es nötig die Eigenschaften des Vp1017 N^{pro} zu charakterisieren.

Um einen möglichen Verlust der Autoproteasefunktion zu untersuchen wurde die Größe und subzelluläre Lokalisation des N^{pro} bestimmt. Das Vp447 exprimierte ein etwa 20kD großes N^{pro}-Protein, das auf Grund seiner guten Löslichkeit in der Zelle diffus in Kern und Cytoplasma nachweisbar ist. Im Gegensatz hierzu zeigte das N^{pro} des Vp1017 eine Größenzunahme um etwa 1-2 kD und ein zusätzliches Signal bei etwa 24kD in der Western Blot Analyse. In der Zelle war das N^{pro} des Vp1017 perinukleär granulär verteilt und kolokalisierte mit einem Marker des ERs. Sowohl die Größenzunahme des Vp1017 N^{pro}, als auch dessen veränderte subzelluläre Lokalisation waren durch ein Ausbleiben der autoproteolytischen Abspaltung vom viralen Polyprotein erklärbar, da der N^{pro} C-Terminus nun durch Spaltung der SP oder SPP generiert werden sollte.

Durch Modifikation der N^{pro}-Spaltstelle des Vp1017 und nachfolgender Untersuchung der resultierenden Viren auf die Eigenschaften des N^{pro} wurde deutlich, dass der Abstand der N^{pro}-Spaltstelle von der Sequenz des Signalpeptids (Core AS 247-255) ausschlaggebend war für die Spaltaktivität der N^{pro}-Autoprotease.

Der Nachweis eines abgespaltenen N^{pro} korrelierte in den untersuchten Viren mit der Fähigkeit des N^{pro}, IRF-3 zu antagonisieren. Jedoch beschreiben Ruggli et al. (2008) für das KSPV die Unabhängigkeit dieser beiden Funktionen. Hierzu wurden Zellen transient mit Plasmiden transfiziert, die für N^{pro}-Core(AS169-242)-GFP kodierten. Die Autoprotease wurde in einem Plasmid durch den Aminosäureaustausch C69A inaktiviert. Die IFN-Promotoraktivität nach Stimulation der Zellen mit dsRNS wurde mittels Luciferaseaktivität bestimmt und als Read-out für die Funktionalität von N^{pro} verwendet. Untersuchungen des BVDV N^{pro} mittels zellulärer Expression (Hilton et al., 2006) zeigten auch eine Unabhängigkeit von IRF-3 antagonistischer Wirkung und Autoproteaseaktivität des N^{pro}. Hingegen beschreiben Gil et al. (2006) die Abhängigkeit des IRF-3 Antagonismus von einer intakten Proteaseaktivität. Dabei wurden verschiedene AS des aktiven Zentrums (E22, H49, C69) im Kontext einer HCV-BVDV-Chimäre mutagenisiert. Erstaunlicherweise kam es nur bei Mutagenese der AS E22 oder H49 zum Verlust der IRF-3 antagonisierenden Eigenschaften des N^{pro}.

Um zu überprüfen, ob ein Verlust der Autoproteaseaktivität des N^{pro} und somit ein Verbleib am pestiviralen Polyprotein im Kontext des Vp447 und des Vp1017 bzw. seiner Abkömmlinge mit einem Verlust der Fähigkeit, IRF-3 zu antagonisieren, korreliert ist, wurden entsprechende Viren mit inaktivierter Proteasedomäne generiert

(C69A) (Tab. 11). Zum ersten Mal war durch das Einfügen der kompensatorischen Mutation in der NS3-Helikasedomäne auch die Untersuchung eines lebensfähigen Vp447 mit inaktivierter N^{pro}-Protease möglich (vgl. Rümenapf et al., 1998). Hierbei zeigte sich, dass ein Ausbleiben der autoproteolytischen Spaltung zur Unfähigkeit des N^{pro}, IRF3 zu antagonisieren, führte und daher die Expression von MxA in den Zellen nachweisbar war. Ein Verbleib von N^{pro} am Polyprotein und damit eine Lokalisation des N^{pro} an der ER-Membran ist daher als ausschlaggebend für den Funktionsverlust anzusehen. Der Widerspruch zu den Ergebnissen von Ruggli et al. (2008) und Hilton et al. (2006) ist durch die Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme zu erklären. Bei Verwendung eines Plasmids (CMV- oder EF1 α -Promotor) zur Proteinproduktion in eukaryotischen Zellen ist mit einer wesentlich stärkeren Expression des Zielproteins zu rechnen, als sie im Rahmen einer Pestivirusinfektion erfolgt. Bei Vorliegen von hohen Konzentrationen eines nicht mit dem ER assoziierten N^{pro}-Core-Vorläuferproteins ist vermutlich noch genügend Restaktivität des N^{pro} vorhanden, um IRF-3 zu antagonisieren. Die Unterschiede zu den Ergebnissen von Gil et al. (2006) könnten durch die Verwendung einer HCV-BVDV-Chimäre bedingt sein oder einfach einen Unterschied zwischen dem N^{pro} des KSPV und des BVDV darstellen.

	wt	C69A	< 4AS	>4AS	FLAG	5Ala
Spaltung	+	-	-	+	+	+/-
MxA	-	+	NA / +	-	-	-

Tab. 11: Darstellung des Verhaltens von N^{pro} im Bezug auf Autoproteaseaktivität (Spaltung) und Antagonisierung von IRF-3 (MxA) bei Modifikation der Proteaseaktivität oder der N^{pro}-Core-Spaltstelle. wt = Vp447; C69A = Inaktivierung der N^{pro}-Protease; < 4AS = weniger als 4 authentische Core-AS zwischen N^{pro} und Signalpeptid; > 4AS = mehr als 4 authentische Core-AS zwischen N^{pro} und Signalpeptid; FLAG = flag-tag zwischen N^{pro} und Signalpeptid; 5Ala = 5 Alanin-Linker zwischen N^{pro} und Signalpeptid; NA = Untersuchung nicht möglich.

Durch das Einfügen von fünf Alaninen zwischen den C-Terminus des N^{pro} und das Signalpeptid konnte die Abspaltung des N^{pro} vom Polyprotein teilweise wiederhergestellt werden (VpCR85). Eine Verzögerung des viralen Wachstums wie im Vp1017 und eine Induktion von MxA waren für das VpCR85 nicht mehr nachweisbar. Auch die Menge der nach Transfektion genomischer RNS gewonnenen Viren war im Vergleich zum Vp1017 erhöht. Dieser Anstieg reichte jedoch nicht aus, um eine dem Wildtyp vergleichbare Virusaussbeute zu erreichen. Hierdurch wurde deutlich, dass ein funktionelles N^{pro} sich positiv auf das virale Wachstum auswirkt. Es

zeigte sich aber auch, dass die kompensatorische Mutation in der NS3-Helikase-Domäne nicht in der Lage ist, die Funktion des Core-Proteins bei der Bildung pestiviraler Partikel in vollem Umfang zu erfüllen.

Untersuchungen zum Wachstum des VpCR85 auf nach der Infektion mit IFN α -behandelten PK15- und STE-Zellen ergaben einen Abfall der Partikelproduktion im Vergleich zum Vp447 erst 48h nach Infektion (Vp1017 24h nach Infektion). Ein vergleichbares Resultat ergab sich auch bei Behandlung der Zellen 16h vor Infektion mit IFN α . Diese Verzögerung der Auswirkung der IFN α -Behandlung auf das Wachstum des VpCR85 deutete an, dass das Virus nicht in der Lage war, sich auszubreiten und somit neue Zellen für die Virusbildung zu rekrutieren. Die Infektionsversuche zeigten, dass VpCR85 in der Lage war, in IFN α -behandelten Zellen infektiöse Partikel zu bilden. Daher sollte die Ursache für die verminderte Ausbreitungsfähigkeit in einer Reduktion der Empfänglichkeit der Zielzellen liegen. Die Empfänglichkeit der Zellen lässt sich durch das prozentuale Verhältnis aus Antigen-positiven, IFN α -behandelten zu Antigen-positiven, unbehandelten Zellen bestimmen. Versuche mit dem VpCR85 ergaben, dass die Empfänglichkeit von PK15- und STE-Zellen – jedoch nicht von SK6-Zellen – bei IFN α -Behandlung 16h vor Infektion im Vergleich zum Vp447 deutlich reduziert war. Diese Ergebnisse implizierten eine Rolle des Core-Proteins bei der Etablierung einer Infektion in Zellen mit aktiviertem IFN-System.

SK6-Zellen stellen im Bezug auf das angeborende Immunsystem eine Besonderheit dar, da sie nur bei IFN-Gabe, jedoch nicht bei Stimuli wie dsRNS, mit einer Aktivierung des IFN-Systems reagieren. Der mangelnde Verlust an Empfänglichkeit für das VpCR85 legte nahe, dass diese Zelllinie noch weitere Defekte im Bereich IFN-regulierter Gene aufweist.

Um den zeitlichen Verlauf der IFN α -vermittelten Hemmung des VpCR85 zu bestimmen, wurde die Empfänglichkeit von PK15- und STE-Zellen bei IFN α -Gabe zu verschiedenen Zeitpunkten (8h, 4h, 0h vor Infektion und 4h nach Infektion) untersucht. Für beide Zelllinien ergab sich ein starker Abfall der Empfänglichkeit für das VpCR85 zwischen den Behandlungszeitpunkten 0h und 4h vor Infektion, der für das Vp447 nicht nachweisbar war. Um diesen Zeitraum mit dem Aktivierungszustand des IFN α -Systems der Zellen korrelieren zu können, wurde ein Nachweis des MxA-Proteins in STE-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IFN α -Gabe durchgeführt. Schon 4h nach IFN α -Behandlung war MxA im Zelllysate nachweisbar. Nach etwa 10h

war das Maximum der Expression erreicht. Da der Abfall der Empfänglichkeit für das VpCR85 bei IFN α -Behandlung 4h vor Infektion nachweisbar war, konnte angenommen werden, dass zum Zeitpunkt der Infektion schon IFN α -induzierte Proteine in den Zellen vorhanden sind. Im Gegensatz dazu bleibt bei IFN α -Behandlung zum Zeitpunkt der Infektion ein Zeitfenster von bis zu 4h, in dem noch keine Produkte IFN α -induzierbarer Gene in den Zellen vorliegen. Auf Grund dieser Überlegungen konnte gefolgert werden, dass die Reduktion der Empfänglichkeit für das VpCR85 durch Vorgänge ausgelöst wird, die frühe Zeitpunkte der Infektion betreffen. Daraus konnte geschlossen werden, dass das Core-Protein wichtig ist für die Etablierung einer Infektion in Zellen mit aktiviertem IFN-System.

Eine Rolle des Core-Proteins bei der Infektion kann durch das im Partikel vorkommende Core-Protein oder durch in der Zelle neusynthetisiertes Core-Protein ausgeübt werden. Gegen eine Bedeutung des Core-Gens und damit der Expression des Core-Proteins zu Beginn der Infektion spricht, dass es nach Transfektion von gleichen Mengen infektiöser genomischer RNS von VpCR85 und Vp447 keinen Unterschied in der Anzahl virales Antigen exprimierender Zellen gab, auch wenn die zu transfizierenden Zellen mit IFN α behandelt wurden.

Daher wurde überprüft, ob das Fehlen des Core-Proteins im viralen Partikel ausschlaggebend für die Reduktion der zellulären Empfänglichkeit für das VpCR85 sein könnte. Hierzu wurde das virale Genom von VpCR85 und Vp447 in Core-Protein exprimierende SK6-Zellen transfiziert, um Core-enthaltende VpCR85 zu generieren. Bei der Überprüfung des Gehalts an Core-Protein der daraufhin gebildeten Viruspartikel zeigte sich eine starke Reduktion der Core-Inkorporation des VpCR85 Partikel im Vergleich zum Vp447. Vorläufige Versuche von Heimann und Rümenapf hatten ergeben, dass die kompensatorische Mutation in der NS3-Helikasedomäne die Inkorporation des Core-Proteins in den Partikel hemmt. Die Ursache für dieses Verhalten ist bisher unklar. Vermutet werden kann eine verstärkte Konkurrenz zwischen NS3 und Core um die virale RNS oder eine Veränderung von Interaktionen der viralen Proteine.

Um Viruspartikel zu erhalten, die die RNS eines Core-Deletions-KSPV enthalten, aber dennoch vergleichbare Mengen an Core-Protein wie das Vp447 in die Partikel integrieren, wurde ein VpCR85 ohne kompensatorische Mutation in der NS3-Helikasedomäne generiert (VpCR173). Nach Transfektion der genomischen RNS in Core exprimierende SK6-Zellen konnte eine dem Wildtyp vergleichbare Menge Core-

Protein in den Viruspartikeln nachgewiesen werden. Hierdurch wurde auch eine quantitative Beurteilung des Partikel-Core-Gehalts im Bezug auf die Empfänglichkeit der Zielzellen möglich. Die Untersuchung der zellulären Empfänglichkeit für die mit Core transkomplementieren VpCR85 und VpCR173 ergab für beide Viren eine Steigerung im Vergleich zu VpCR85 ohne Core-Protein im Viruspartikel. Eine annähernd dem Wildtyp entsprechende Empfänglichkeit der Zellen konnte nur mit Core enthaltendem VpCR173 erreicht werden. Diese Versuche zeigten, dass das Core-Protein des KSPV Partikels einen wichtigen Faktor bei der Infektion von Zellen mit aktiviertem IFN-System darstellt. Dabei verhält sich die Menge des im Partikel vorhandenen Core-Proteins proportional zur Empfänglichkeit.

Welche Rückschlüsse lassen sich hieraus über die Funktion des Core-Proteins bei der Infektionsetablierung ziehen? Ein Mengeneffekt legt nahe, dass Core nicht als spezifischer Inhibitor zellulärer Faktoren wirkt, sondern vielmehr durch histonartige Interaktion mit dem viralen Genom eine Schutzfunktion einnimmt. Untersuchungen am Partikel des HCV zeigten, dass etwa 1000 Core Moleküle in jedem Virion enthalten sind (Bartenschlager, personal communication), und unterstützen daher diese Hypothese.

Doch wie genau kann das Core-Protein diese Funktion ausüben? Pestiviren verwenden zur Infektion einer Zelle nach Kontakt mit dem Rezeptor (für das KSPV noch nicht bestimmt) die Clathrin-vermittelte Endozytose. Die Fusion mit der Membran des Endozytosevesikels erfolgt im Stadium des späten Endosoms, bei einem pH Wert von 5. Zu diesem Zeitpunkt sollten die endosomalen Vesikel auf ihrem Weg durch das Zytoplasma in der Nähe des kernnahen ER zu finden sein. Durch die Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran wird dann das virale Nukleokapsid in das Zytoplasma entlassen. Was hier mit dem Nukleokapsid geschieht ist unklar. Untersuchungen an Alphaviren beschreiben eine Rolle der S28 Untereinheit des Ribosoms im Prozess der Freisetzung der RNS aus dem Nukleokapsid (Wengler, 2009). Dieser Mechanismus bietet den Vorteil, dass die genomische RNS geschützt bis an den Ort der Translation gelangt, was entscheidend für den Erfolg der Infektion ist. Gerade bei Aktivierung des IFN-Systems der Zelle scheint dies für das Virus auf Grund des Schutzes vor Abbau der genomischen RNS und der schnelleren Translationsinitiation vorteilhaft zu sein.

Welche anderen Möglichkeiten der Core-Funktion bieten sich zwischen Freisetzung aus der Hülle und Ankunft am Ribosom? Denkbar wäre ein Schutz des viralen Genoms vor zellulären RNasen, eine Effizienzsteigerung der Translationsinitiation oder eine Abschirmung von dsRNS-Strukturen des viralen Genoms vor zellulären Sensoren (Abb. 46).

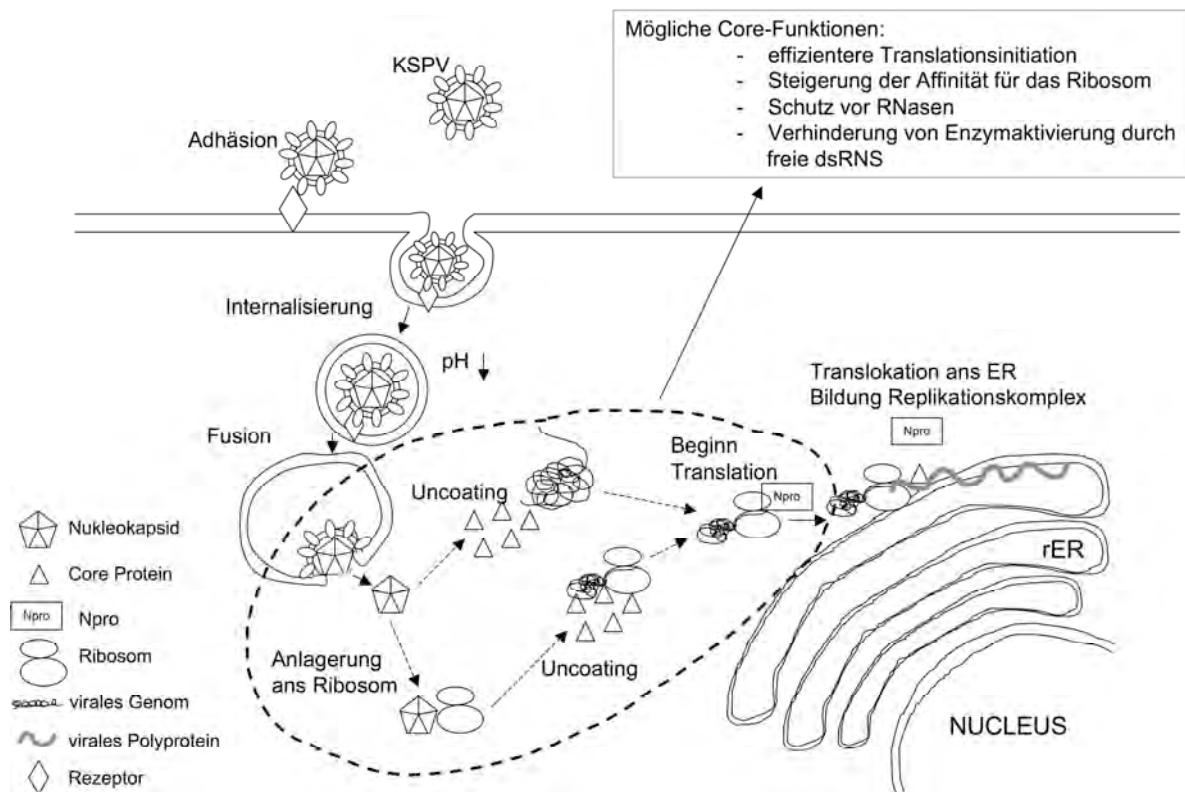


Abb. 46: Schematische Darstellung der KSPV-Infektion und möglicher Core-Funktionen zu frühen Zeitpunkten der Infektion (durch gestrichelte Linie abgegrenzt). Gestrichelte Pfeile zeigen hypothetische Vorgänge an.

Durch Interferone kommt es in der Zelle zur Expression von mehr als 300 Proteinen. Von vielen fehlen bisher Beschreibungen der Funktion. Es bleibt ergo eine Vielzahl von Proteinen, die potentiell für den Abfall der Permissivität für das VpCR85 verantwortlich sein könnten. Jedoch erscheint es wahrscheinlich, dass RNS-degradierende Enzyme oder durch dsRNS aktivierte, antivirale Faktoren involviert sind.

Mit der Entdeckung eines lebensfähigen Core Deletions KSPV stand zum ersten Mal ein Werkzeug zur Verfügung, Funktionen des Core-Proteins, die von der Partikelbildung unabhängig sind, zu untersuchen. In der Familie *Flaviviridae* wurden bisher nur zwei Viren, GBV-A und -C, beschrieben, die kein Core-Protein kodieren. Also scheint die Partikelbildung bei Mitgliedern dieser Familie prinzipiell auch ohne

das Vorhandensein eines Core-Proteins möglich zu sein. Da diese Viren apathogen sind besteht im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit die Möglichkeit, dass das Core-Protein des KSPV ein Virulenzfaktor ist.

5. Zusammenfassung

Das KSPV Core-Protein bildet zusammen mit dem viralen Genom das Nukleokapsid des Viruspartikels. Seine Plastizität wurde durch gezielte Verkleinerung und Vergrößerung der Core-kodierenden Region untersucht.

1) Deletionen der Core-Aminosäuren (AS) 179-180,194-198, 208-212 oder 254-255 wirken sich stark negativ auf die Bildung von Viruspartikeln aus. Große Bereiche basischer AS (213-231) können ohne starke Reduktion der Virusproduktion entfernt werden.

2) Eine Vergrößerung des Core-Proteins durch Duplikation oder Triplikation des Core-Gens sowie durch das Einfügen von ein bis drei YFP-Genen zwischen zwei Core-Genen ist möglich. Dabei werden die vergrößerten Proteine in die gebildeten Viruspartikel integriert.

3) Die korrekte räumliche Anordnung von Core-Domänen ist für die Funktion des Proteins essentiell.

4) Der Aminosäureaustausch Asparagin 2256 zu Tyrosin in der NS3-Helikase-Domäne steigert die Virusbildung eines subvitalen KSPV, das für YFP-Core kodiert, um mehr als das Hundertfache.

Von der Partikelbildung unabhängige Core-Funktionen sollten durch die Charakterisierung eines Core-Deletions-KSPV (Vp1017) untersucht werden.

1) Das Vp1017 ist auf primären porzinen Zellen nicht vermehrungsfähig. Porzine Zelllinien mit aktiviertem IFN-System zeigen eine stark verminderte Empfänglichkeit für das Vp1017 und eine Reduktion der Virusproduktion.

2) Das Vp1017 besitzt ein nicht funktionelles N^{pro}. Es erfolgt keine Abspaltung vom viralen Polyprotein und somit auch keine Antagonisierung von IRF-3. Die Insertion von fünf AS an der N^{pro}-Core Spaltstelle ist ausreichend, um die Funktionalität von N^{pro} wiederherzustellen (VpCR85).

3) Die Empfänglichkeit von porzinen Zelllinien mit aktiviertem IFN-System für das VpCR85 ist deutlich herabgesetzt. Diese Reduktion der Empfänglichkeit kann durch das Vorhandensein von Core im Viruspartikel, in Abhängigkeit von der Menge, teilweise bis gänzlich aufgehoben werden.

6. Summary

The CSFV nucleocapsid consists of the viral RNA genome and the Core-Protein. Its plasticity was examined by diminution and multiplication of the Core coding region and by insertion of nonviral sequences between a Core dimer.

- 1) Deletion of Core amino acids (aa) 179-180, 194-198, 208-212 or 254-255 strongly decreases virus formation. Large stretches of predominantly basic aa (213-233) can be deleted without a significant reduction of virus production.
- 2) The enlargement of the CSFV Core-Protein by duplicating or triplicating the Core coding region, as well as the insertion of one – three YFP genes between a Core duplicate still allow for the generation of virus. These modified proteins are integrated into the viral particles.
- 3) Correct spatial arrangement of Core domains is essential for function.
- 4) Virus output of a subvital CSFV encoding for YFP-Core increases more than 100-fold if asparagin 2256 is exchanged to tyrosin.

A Core deletion CSFV (Vp1017) was employed to study assembly independent Core functions.

- 1) Vp1017 is nonviable in primary porcine cells. The susceptibility of porcine cell lines with an activated IFN-system for Vp1017 is strongly reduced. Additionally, virus production is decreased.
- 2) The N^{pro} of Vp1017 is non-functional due to lack of cleavage from the polyprotein and inability to antagonize IRF3. An insertion of five amino acids at the N^{pro}-Core cleavage site (VpCR85) is sufficient to restore N^{pro} function.
- 3) Porcine cell lines with an activated IFN-system exhibit a strong decline of susceptibility for VpCR85. This loss of susceptibility is counteracted by presence of Core in the virus particles, the effect being dependent upon the amount of Core that is integrated into the particles.

7. Literatur

- Ait-Ali, T., Wilson, A. W., Finlayson, H., Carre, W., Ramaiahgari, S. C., Westcott, D. G., Waterfall, M., Frossard, J. P., Baek, K. H., Drew, T. W., Bishop, S. C. & Archibald, A. L. (2009) Functional analysis of the porcine USP18 and its role during porcine arterivirus replication. *Gene*, **439**, 35-42.
- Akira, S. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Advances in Immunology*, Vol 78, **78**, 1-56.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature*, **413**, 732-738.
- Andreesen, R., Picht, J. & Lohr, G. W. (1983) Primary cultures of human blood-borne Macrophages grown on hydrophobic Teflon Membranes. *Journal of Immunological Methods*, **56**, 295-304.
- Baigent, S. J., Zhang, G., Fray, M. D., Flick-Smith, H., Goodbourn, S. & McCauley, J. W. (2002) Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *Journal of Virology*, **76**, 8979-8988.
- Baker, J. C. (1987) Bovine Viral Diarrhea Virus - a Review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **190**, 1449-1458.
- Bauhofer, O., Summerfield, A., McCullough, K. C. & Ruggli, N. (2005) Role of double-stranded RNA and N-pro of classical swine fever virus in the activation of monocyte-derived dendritic cells. *Virology*, **343**, 93-105
- Bauhofer, O., Summerfield, A., Sakoda, Y., Tratschin, J. D., Hofmann, M. A. & Ruggli, N. (2007) Classical swine fever virus N-pro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *Journal of Virology*, **81**, 3087-3096.
- Bautista, M. J., Ruiz-Villamor, E., Salguero, F. J., Sanchez-Cordon, P. J., Carrasco, L. & Gomez-Villamandos, J. C. (2002) Early platelet aggregation as a cause of thrombocytopenia in classical swine fever. *Veterinary Pathology*, **39**, 84-91.
- Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H. J. (1998) Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Journal of Virology*, **72**, 5165-5173.
- Becher, P., Ramirez, R. A., Orlich, M., Rosales, S. C., Konig, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeier, H. & Thiel, H. J. (2003) Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, **311**, 96-104.

- Bensaude, E., Turner, J. L. E., Wakeley, P. R., Sweetman, D. A., Pardieu, C., Drew, T. W., Wileman, T. & Powel, P. P. (2004) Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. *Journal of General Virology*, **85**, 1029-1037.
- Bink, H. H. J. & Pleij, C. W. A. (2002) RNA-protein interactions in spherical viruses. *Archives of Virology*, **147**, 2261-2279.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratnier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J. P., Penin, F. & McLauchlan, J. (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus Core-Protein to lipid droplets. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 22236-22247.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. & Lavergne, J. P. (2005) Hepatitis C virus Core-Protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *Journal of Virology*, **79**, 11353-11365.
- Castelli, J. C., Hassel, B. A., Maran, A., Paranjape, J., Hewitt, J. A., Li, X. L., Hsu, Y. T., Silverman, R. H. & Youle, R. J. (1998) The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **5**, 313-320.
- Catic, A., Fiebigler, E., Korbel, G. A., Blom, D., Galardy, P. J. & Ploegh, H. L. (2007) Screen for ISG15-crossreactive deubiquitinases. *PLoS One*, **2**, e679.
- Chen, Z. H., Rijnbrand, R., Jangra, R. K., Devaraj, S. G., Qu, L., Ma, Y. H., Lemon, S. M. & Li, K. (2007) Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Virology*, **366**, 277-292.
- Clemens, M. J. & Williams, B. R. G. (1978) Inhibition of cell-free Protein-Synthesis by PPPA2'P5'A2'P5'A - novel Oligonucleotide synthesised by Interferon-treated L-cell Extracts. *Cell*, **13**, 565-572.
- Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K. & Retzel, E. (1988) Proteins encoded by Bovine Viral Diarrhea Virus - the genomic Organization of a Pestivirus. *Virology*, **165**, 200-208.
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. & Purchio, A. F. (1988) Molecular-cloning and Nucleotide-Sequence of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhea Virus. *Virology*, **165**, 191-199.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. & Dubovi, E. J. (1988) Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea infections. *J Virol*, **62**, 2823-2827.
- Dar, A. C., Dever, T. E. & Sicheri, F. (2005) Higher-order substrate recognition of eIF2 alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell*, **122**, 887-900.

- Dcunha, J., Ramanujam, S., Wagner, R. J., Witt, P. L., Knight, E. & Borden, E. C. (1996) In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *Journal of Immunology*, **157**, 4100-4108.
- Deblandre, G. A., Marinx, O. P., Evans, S. S., Majjaj, S., Leo, O., Caput, D., Huez, G. A. & Wathélet, M. G. (1995) Expression Cloning of an Interferon-inducible 17-kDa Membrane-Protein implicated in the Control of Cell-Growth. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 23860-23866.
- Depner, K., Bauer, T. & Liess, B. (1992) Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev Sci Tech*, **11**, 885-893.
- Depner, K., Gruber, A. & Liess, B. (1994) Experimental-Infection of weaner Pigs with a Field Isolate of Hog-Cholera Classical-Swine-Fever Virus derived from a recent Outbreak in lower Saxony .1. Clinical, virological and serological Findings. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, **81**, 370-373.
- Depner, K. R., Moennig, V. & Liess, B. (1997) Epidemiological aspects of the infectious biology of classical swine fever. *Praktische Tierarzt*, **78**, 63-67.
- Der, S. D., Yang, Y. L., Weissmann, C. & Williams, B. R. G. (1997) A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 3279-3283.
- Der, S. D., Zhou, A. M., Williams, B. R. G. & Silverman, R. H. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15623-15628.
- Doyle, S. E., Vaidya, S. A., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P. W., Wu, T. T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M. E., Modlin, R. L. & Cheng, G. (2002) IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*, **17**, 251-263.
- Dunne, H. W., Hokanson, J. F. & Luedke, A. J. (1959) The Pathogenesis of Hog Cholera. 1. Route of Entrance of the Virus into the Animal Body. *American Journal of Veterinary Research*, **20**, 615-618.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rumenapf, T. & Thiel, H. J. (1996) Processing in the pestivirus E2-NS2 region: Identification of proteins p7 and E2p7. *Journal of Virology*, **70**, 4131-4135.
- Enzmann, P. J. & Weiland, F. (1978) Structural Similarities of Hog-Cholera Virus with Togaviruses. *Archives of Virology*, **57**, 339-348.
- Fan, Z. C. & Bird, R. C. (2008) Generation and characterization of an N-pro-disrupted marker bovine viral diarrhea virus derived from a BAC cDNA. *Journal of Virological Methods*, **151**, 257-263.

- Fan, Z. Y., Yang, Q. R., Twu, J. S. & Sherker, A. H. (1999) Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and Core-Protein. *Journal of Medical Virology*, **59**, 131-134.
- Fauquet, C. M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U.D.a.L.A. Ball (2005) *Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Floydsmith, G., Slattery, E. & Lengyel, P. (1981) Interferon Action - RNA Cleavage Pattern of a (2'-5')Oligoadenylate-dependent Endonuclease. *Science*, **212**, 1030-1032.
- Gallei, A., Blome, S., Gilgenbach, S., Tautz, N., Moennig, V. & Becher, P. (2008) Cytopathogenicity of classical swine fever virus correlates with attenuation in the natural host. *Journal of Virology*, **82**, 9717-9729.
- Gastaminza, P., Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2006) Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *Journal of Virology*, **80**, 11074-11081.
- Gil, L., Ansari, I. H., Vassilev, V., Liang, D. L., Lai, V. C. H., Zhong, W. D., Hong, Z., Dubovi, E. J. & Donis, R. O. (2006) The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus N-pro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *Journal of Virology*, **80**, 900-911.
- Gomez-Villamandos, J. C., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., Sanchez, C. P., Sanchez-Cordon, P. J., Salguero, F. J. & Jover, A. (2001) Morphological and immunohistochemical changes in splenic macrophages of pigs infected with classical swine fever. *Journal of Comparative Pathology*, **125**, 98-109.
- Gomez-Villamandos, J. C., Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Sanchez-Cordon, P. J., Bautista, M. J. & Sierra, M. A. (2003) Classical swine fever: Pathology of bone marrow. *Veterinary Pathology*, **40**, 157-163.
- Haller, O., Arnheiter, H., Lindenmann, J. & Gresser, I. (1980) Host Gene influences Sensitivity to Interferon Action Selectivity for Influenza-Virus. *Nature*, **283**, 660-662.
- Hansen, J. C., Lu, X., Ross, E. D. & Woody, R. W. (2006) Intrinsic protein disorder, amino acid composition, and histone terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 1853-1856.
- Harada, T., Tautz, N. & Thiel, H. J. (2000) E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: Processing and functional studies. *Journal of Virology*, **74**, 9498-9506.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, **303**, 1526-1529.
- Heimann, M., Roman-Sosa, G., Martoglio, B., Thiel, H. J. & Rumenapf, T. (2006) Core-Protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *Journal of Virology*, **80**, 1915-1921.

- Hilton, L., Moganeradj, K., Zhang, G., Chen, Y. H., Randall, R. E., McCauley, J. W. & Goodbourn, S. (2006) The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *Journal of Virology*, **80**, 11723-11732
- Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. (2006) Type I inteferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, **25**, 349-360.
- Honda, K. & Taniguchi, T. (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews Immunology*, **6**, 644-658.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. & Taniguchi, T. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, **434**, 772-777.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. & Hartmann, G. (2006) 5'-triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, **314**, 994-997.
- Horzinek, M., Maess, J. & Laufs, R. (1971) Studies on Substructure of Togaviruses .2. Analysis of Equine Arteritis, Rubella, Bovine Viral Diarrhea and Hog Cholera Viruses. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, **33**, 306-+.
- Horzinek, M., Reczko, E. & Petzoldt, K. (1967) On Morphology of Hog Cholera Virus- (brief report). *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, **21**, 475-&.
- Hovanessian, A. G. & Justesen, J. (2007) The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: Unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie*, **89**, 779-788.
- Hsu, L. C., Park, J. M., Zhang, K. Z., Luo, J. L., Maeda, S., Kaufman, R. J., Eckmann, L., Guiney, D. G. & Karin, M. (2004) The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature*, **428**, 341-345.
- Hulst, M. M., Himes, G., Newbiggin, E. D. & Moormann, R. J. M. (1994) Glycoprotein E2 of Classical Swine Fever Virus – Expression in Insect Cells and Identification as a Ribonuclease. *Virology*, **200**, 558-565
- Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **13**, 95-109.
- Iordanov, M. S., Paranjape, J. M., Zhou, A. M., Wong, J., Williams, B. R. G., Meurs, E. F., Silverman, R. H. & Magun, B. E. (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: Involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 617-627.

- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S. & McCauley, J. W. (2004) Role for bovine viral diarrhea virus E-rns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *Journal of Virology*, **78**, 136-145
- Ivanyi-Nagy, R., Lavergne, J. P., Gabus, C., Ficheux, D. & Darlix, J. L. (2008) RNA chaperoning and intrinsic disorder in the Core-Proteins of Flaviviridae. *Nucleic Acids Research*, **36**, 712-725.
- Jamin, A., Gorin, S., Cariolet, R., Le Potier, M. F. & Kuntz-Simon, G. (2008) Classical swine fever virus induces activation of plasmacytoid and conventional dendritic cells in tonsil, blood, and spleen of infected pigs. *Veterinary Research*, **39**.
- Janeway, C. A. & Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, **20**, 197-216.
- Jones, C. T., Ma, L. X., Burgner, J. W., Groesch, T. D., Post, C. B. & Kuhn, R. J. (2003) Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *Journal of Virology*, **77**, 7143-7149.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q. P., Jankowsky, E., Pyle, A. M. & Fisher, P. B. (2002) mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 637-642.
- Katze, M. G., He, Y. P. & Gale, M. (2002) Viruses and interferon: A fight for supremacy. *Nature Reviews Immunology*, **2**, 675-687.
- Kerr, I. M., Brown, R. E. & Hovanessian, A. G. (1977) Nature of Inhibitor of Cell-free Protein-Synthesis formed in Response to Interferon and double-stranded-RNA. *Nature*, **268**, 540-542.
- Kirkland, P. D., Frost, M., Finlaison, D. S., King, K. R., Ridpath, J. F. & Gu, X. (2007) Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus Research*, **129**, 26-34.
- Knoetig, S. M., McCullough, K. C. & Summerfield, A. (2002) Lipopolysaccharide-induced impairment of classical swine fever virus infection in monocytic cells is sensitive to 2-aminopurine. *Antiviral Research*, **53**, 75-81.
- Kochs, G. & Haller, O. (1999) Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 2082-2086.
- Kochs, G., Trost, M., Janzen, C. & Haller, O. (1998) MxA GTPase: Oligomerization and GTP-Dependent interaction with viral RNP target structures. *Methods-a Companion to Methods in Enzymology*, **15**, 255-263.
- Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V. & Hellen, C. U. T. (2000) An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, **74**, 6242-6250

- Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V. & Hellen, C. U. T. (2000) Ribosomal binding to the internal ribosomal entry site of classical swine fever virus. *Rna-a Publication of the Rna Society*, **6**, 1791-1807
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M. L., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H. & Donnelly, R. P. (2003) IFN-lambda s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*, **4**, 69-77.
- Krey, T., Moussay, E., Thiel, H. J. & Rumenapf, T. (2006) Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhea virus. *Journal of Virology*, **80**, 10862-10867.
- Krey, T., Thiel, H. J. & Rumenapf, T. (2005) Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *Journal of Virology*, **79**, 4191-4200.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S. & Strauss, J. H. (2002) Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, **108**, 717-725.
- Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J. & Williams, B. R. G. (1994) Double-stranded RNA-dependent Protein-Kinase activates Transcription Factor NF-KAPPA-B by Phosphorylating I-KAPPA-B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 6288-6292.
- La Rocca, S. A., Herbert, R. J., Crooke, H., Drew, T. W., Wileman, T. E. & Powell, P. P. (2005) Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, N-pro. *Journal of Virology*, **79**, 7239-7247.
- Lackner, T., Muller, A., Konig, M., Thiel, H. J. & Tautz, N. (2005) Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *Journal of Virology*, **79**, 9746-9755.
- Lackner, T., Muller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H. J., Gorbalenya, A. E. & Tautz, N. (2004) Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *Journal of Virology*, **78**, 10765-10775.
- Laevens, H., Koenen, F., Deluyker, H. & de Kruif, A. (1999) Experimental infection of slaughter pigs with classical swine fever virus: transmission of the virus, course of the disease and antibody response. *Veterinary Record*, **145**, 243-248.
- LaFleur, D. W., Nardelli, B., Tsareva, T., Mather, D., Feng, P., Semenuk, M., Taylor, K., Buergin, M., Chinchilla, D., Roshke, V., Chen, G. X., Ruben, S. M., Pitha, P. M., Coleman, T. A. & Moore, P. A. (2001) Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 39765-39771.

- Lai, V. C. H., Zhong, W. D., Skelton, A., Ingravallo, P., Vassilev, V., Donis, R. O., Hong, Z. & Lau, J. Y. N. (2000) Generation and characterization of a hepatitis C virus NS3 protease-dependent bovine viral diarrhea virus. *Journal of Virology*, **74**, 6339-6347.
- Langer, J. A., Cutrone, E. C. & Kotenko, S. (2004) The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **15**, 33-48.
- Leary, T. P., Desai, S. M., Yamaguchi, J., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Dawson, G. J. & Mushahwar, I. K. (1996) Species-specific variants of GB virus A in captive monkeys. *Journal of Virology*, **70**, 9028-9030.
- Lee, Y. M., Tscherne, D. M., Yun, S. I., Frolov, I. & Rice, C. M. (2005) Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. *Journal of Virology*, **79**, 3231-3242.
- Lefevre, F., Guillomot, M., D'Andrea, S., Battegay, S. & La Bonnardiere, C. (1998) Interferon-delta: The first member of a novel type I interferon family. *Biochimie*, **80**, 779-788.
- Levin, D. & London, I. M. (1978) Regulation of Protein-Synthesis – Activation by double-stranded RNA of a Protein-Kinase that phosphorylates Eukaryotic Initiation Factor-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**, 1121-1125.
- Liess, B., Frey, H. R., Kittsteiner, H., Baumann, F. & Neumann, W. (1974) Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a "slow virus infection". *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **81**, 481-487.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W. & Rice, C. M. (1994) Processing in the Hepatitis-C Virus E2-NS2 Region – Identification of P7 and 2 distinct E2-specific Products with different C-Termini. *Journal of Virology*, **68**, 5063-5073.
- Lindenbach, B. D., H. J. Thiel and C. M. Rice (2007) *Flaviviridae: The Viruses and their Replication*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York.
- Linnen, J., Wages, J., ZhangKeck, Z. Y., Fry, K. E., Krawczynski, K. Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shih, J. W. K., Young, L., Piatak, M., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J. C., Morris, T., Hyams, K. C., Ismay, S., Lifson, J. D., Hess, G., Fount, S. K. H., Thomas, H., Bradley, D., Margolis, H. & Kim, J. P. (1996) Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science*, **271**, 505-508.
- Loeb, K. R. & Haas, A. L. (1992) The Interferon-inducible 15-kDa Ubiquitin Homolog conjugates to intracellular Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 7806-7813.
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. & Flavell, R. A. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 5598-5603.

- Ma, Y. H., Yates, J., Liang, Y. Q., Lemon, S. M. & Yi, M. K. (2008) NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *Journal of Virology*, **82**, 7624-7639.
- Macovei, A., Zitzmann, N., Lazar, C., Dwek, R. A. & Branza-Nichita, N. (2006) Brefeldin A inhibits pestivirus release from infected cells, without affecting its assembly and infectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **346**, 1083-1090.
- Magkouras, I., Matzener, P., Rumenapf, T., Peterhans, E. & Schweizer, M. (2008) RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by E-rns of pestiviruses. *Journal of General Virology*, **89**, 2501-2506
- Mandl, C. W. (2004) Flavivirus immunization with capsid-deletion mutants: Basics, benefits, and barriers. *Viral Immunology*, **17**, 461-472.
- Mandl, C. W., Heinz, F. X. & Kunz, C. (1988) Sequence of the Structural Proteins of Tick-borne Encephalitis-Virus (Western Subtype) and Comparative-Analysis with other Flaviviruses. *Virology*, **166**, 197-205.
- Marie, I., Durbin, J. E. & Levy, D. E. (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *Embo Journal*, **17**, 6660-6669.
- Matzener, P., Magkouras, I., Rumenapf, T., Peterhans, E. & Schweizer, M. (2009) The viral RNase E-rns prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. *Virus Research*, **140**, 15-23
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H. R. & Rumenapf, T. (2004) CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *Journal of Virology*, **78**, 1792-1799.
- Mayer, D., Hofmann, M. A. & Tratschin, J. D. (2004) Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N-pro gene. *Vaccine*, **22**, 317-328.
- McClurkin, A. W., Bolin, S. R. & Coria, M. F. (1985) Isolation of a cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*, **186**, 568-569.
- McLauchlan, J. (2000) Properties of the hepatitis C virus Core-Protein: a structural protein that modulates cellular processes. *Journal of Viral Hepatitis*, **7**, 2-14.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus Core-Protein to lipid droplets. *Embo Journal*, **21**, 3980-3988.
- Medzhitov, R. & Janeway, C. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, **173**, 89-97.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. J. & Kummerer, B. M. (1997) Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs (vol 70, pg 8608, 1996). *Journal of Virology*, **71**, 1735-1735.

- Meyers, G. & Thiel, H. J. (1996) In *Advances in Virus Research*, Vol 47 pp. 53-118.
- Moennig, V., Floegel-Niesmann, G. & Greiser-Wilke, I. (2003) Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. *Veterinary Journal*, **165**, 11-20.
- Murray, C. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2008) Bovine viral diarrhea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *Journal of Virology*, **82**, 1294-1304.
- Nakanishi, M., Tanaka, N., Mizutani, Y., Mochizuki, M., Ueno, Y., Nakamura, K. T. & Kitade, Y. (2005) Functional characterization of 2',5'-linked oligoadenylate binding determinant of human RNase L. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 41694-41699.
- Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B. R. G. & Qin, J. (2000) A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *Embo Journal*, **19**, 5567-5574.
- Nettleton, P. F. & Entrican, G. (1995) Ruminant Pestiviruses. *British Veterinary Journal*, **151**, 615-642.
- Nunez, A., Gomez-Villamandos, J. C., Sanchez-Cordon, P. J., de Marco, M. F., Pedrera, M., Salguero, F. J. & Carrasco, L. (2005) Expression of proinflammatory cytokines by hepatic macrophages in acute classical swine fever. *Journal of Comparative Pathology*, **133**, 23-32.
- Oritani, K., Kincade, P. W. & Tomiyama, Y. (2001) Limitin: an interferon-like cytokine without myeloerythroid suppressive properties. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, **79**, 168-174.
- Patel, R. C. & Sen, G. C. (1998) PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *Embo Journal*, **17**, 4379-4390.
- Patkar, C. G. & Kuhn, R. J. (2008) Yellow fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *Journal of Virology*, **82**, 3342-3352.
- Pellerin, C., Vandenhurk, J., Lecomte, J. & Tijssen, P. (1994) Identification of a new Group of Bovine Viral Diarrhea Virus-Strains associated with severe Outbreaks and high Mortalities. *Virology*, **203**, 260-268.
- Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, **202**, 8-32.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. & Sousa, C. R. E. (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, **314**, 997-1001.
- Poole, T. L., Wang, C. Y., Popp, R. A., Potgieter, L. N. D., Siddiqui, A. & Collett, M. S. (1995) Pestivirus Translation Initiation occurs by Internal-Ribosomal Entry. *Virology*, **206**, 750-754.

- Potgieter, L. N. D., McCracken, M. D., Hopkins, F. M. & Guy, J. S. (1985) Comparison of pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *American Journal of Veterinary Research*, **46**, 151-153.
- Ramaiah, K. V. A., Davies, M. V., Chen, J. J. & Kaufman, R. J. (1994) Expression of mutant Eukaryotic-Initiation-Factor-2-Alpha Subunit (EIF-2-ALPHA) reduces Inhibition of Guanine-Nucleotide Exchange Activity of EIF-2B mediated by EIF-2-ALPHA Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, **14**, 4546-4553.
- Rebouillat, D. & Hovanessian, A. G. (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: Interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **19**, 295-308.
- Reimann, I., Semmler, I. & Beer, M. (2007) Packaged replicons of bovine viral diarrhea virus are capable of inducing a protective immune response. *Virology*, **366**, 377-386.
- Ressang, A. A. (1973) Studies on Pathogenesis of Hog-Cholera .1. Demonstration of Hog-Cholera Virus subsequent to oral Exposure. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B-Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases Immunology Food Hygiene Veterinary Public Health*, **20**, 256-271.
- Ressang, A. A. (1973) Studies on Pathogenesis of Hog-Cholera .2. Virus Distribution in Tissue and Morphology of Immune-Response. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B-Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases Immunology Food Hygiene Veterinary Public Health*, **20**, 272-288.
- Ridpath, J. F. & S.R., B. (1995) The genomic sequence of virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from a type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, **212**, 39-46.
- Rijnbrand, R., vanderStraaten, T., vanRijn, P. A., Spaan, W. J. M. & Bredenbeek, P. J. (1997) Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *Journal of Virology*, **71**, 451-457.
- Roberts, R. M., Ealy, A. D., Alexenko, A. P., Han, C. S. & Ezashi, T. (1999) Trophoblast interferons. *Placenta*, **20**, 259-264.
- Roberts, W. K., Hovanessian, A., Brown, R. E., Clemens, M. J. & Kerr, I. M. (1976) Interferon-mediated Protein-Kinase and Low-Molecular-Weight Inhibitor of Protein-Synthesis. *Nature*, **264**, 477-480.
- Ronecker, S., Zimmer, G., Herrler, G., Greiser-Wilke, I. & Grummer, B. (2008) Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *Journal of General Virology*, **89**, 2114-2121.
- Ruggli, N., Bird, B. H., Liu, L., Bauhofer, O., Tratschin, J. D. & Hofmann, M. A. (2005) N-pro of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alpha/beta induction. *Virology*, **340**, 265-276

- Ruggli, N., Summerfield, A., Fiebach, A. R., Guzylack-Piriou, L., Bauhofer, O., Lamm, C. G., Waltersperger, S., Matsuno, K., Liu, L., Gerber, M., Choi, K. H., Hofmann, M. A., Sakoda, Y. & Tratschin, J. D. (2009) Classical Swine Fever Virus Can Remain Virulent after Specific Elimination of the Interferon Regulatory Factor 3-Degrading Function of N-pro. *Journal of Virology*, **83**, 817-829.
- Ruggli, N., Tratschin, J. D., Schweizer, M., McCullough, K. C., Hofmann, M. A. & Summerfield, A. (2003) Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: Evidence for a novel function of N-pro. *Journal of Virology*, **77**, 7645-7654.
- Rümenapf, T., Meyers, G., Stark, R. & Thiel, H. J. (1991) Molecular Characterization of Hog-Cholera-Virus. *Archives of Virology*, 7-18.
- Rümenapf, T., Stark, R., Heimann, M. & Thiel, H. J. (1998) N-terminal protease of pestiviruses: Identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *Journal of Virology*, **72**, 2544-2547.
- Rümenapf, T. & Thiel, H. J. (2008) *Molecular Biology of Pestiviruses*, Caister Academic Press.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H. & Thiel, H. J. (1993) Processing of the Envelope Glycoproteins of Pestiviruses. *Journal of Virology*, **67**, 3288-3294.
- Ruvolo, P. P., Gao, F. Q., Blalock, W. L., Deng, X. M. & May, W. S. (2001) Ceramide regulates protein synthesis by a novel mechanism involving the cellular PKR activator RAX. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 11754-11758.
- Sanchez-Cordon, P. J., Nunez, A., Salguero, F. J., Carrasco, L. & Gomez-Villamandos, J. C. (2005) Evolution of T lymphocytes and cytokine expression in classical swine fever (CSF) virus infection. *Journal of Comparative Pathology*, **132**, 249-260.
- Sanchez-Cordon, P. J., Nunez, A., Salguero, F. J., Pedrera, M., de Marco, M. F. & Gomez-Villamandos, J. C. (2005) Lymphocyte apoptosis and thrombocytopenia in spleen during classical swine fever: Role of macrophages and cytokines. *Veterinary Pathology*, **42**, 477-488.
- Sanchez-Cordon, P. J., Romanini, S., Salguero, F. J., Nunez, A., Bautista, M. J., Jover, A. & Gomez-Villamandos, J. C. (2002) Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever. *Journal of Comparative Pathology*, **127**, 239-248.
- Sanchez-Cordon, P. J., Romanini, S., Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Carrasco, L. & Gomez-Villamandos, J. C. (2003) A histopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of the intestine in pigs inoculated with classical swine fever virus. *Veterinary Pathology*, **40**, 254-262.
- Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (1998) Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *Febs Letters*, **441**, 106-110.

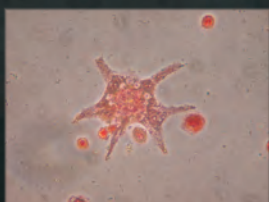
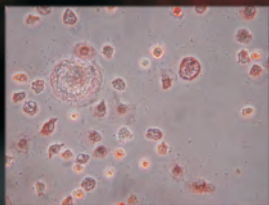
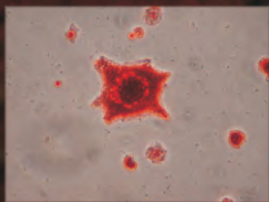
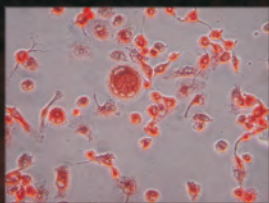
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, **13**, 539-548.
- Schlick, P., Taucher, C., Schittl, B., Tran, J. L., Kofler, R. M., Schueler, W., von Gabain, A., Meinke, A. & Mandl, C. W. (2009) Helices alpha 2 and alpha 3 of West Nile Virus Capsid Protein Are Dispensable for Assembly of Infectious Virions. *Journal of Virology*, **83**, 5581-5591.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneiderscherzer, E. & Thiel, H. J. (1993) Identification of a Structural Glycoprotein of an RNA Virus as a Ribonuclease. *Science*, **261**, 1169-1171.
- Schweizer, M., Matzener, P., Pfaffen, G., Stalder, H. & Peterhans, E. (2006) "Self" and "nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: Bovine viral diarrhea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *Journal of Virology*, **80**, 6926-6935.
- Sen, G. C. & Peters, G. A. (2007) Viral stress-inducible genes. *Advances in Virus Research*, Vol 70, **70**, 233-263.
- Sen, G. C. & Sarkar, S. N. (2007) The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Interferon: the 50th Anniversary*, **316**, 233-250.
- Shaw, I. G., Winkler, C. E. & Terlecki, S. (1967) Experimental reproduction of hypomyelogenesis congenita of lambs. *Veterinary Record*, **81**, 115-116.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W. F., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F. J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D. & Klucher, K. M. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology*, **4**, 63-68.
- Stark, R., Meyers, G., Rumenapf, T. & Thiel, H. J. (1993) Processing of Pestivirus Polyprotein – Cleavage Site between Autoprotease and Nucleocapsid Protein of Classical Swine Fever Virus. *Journal of Virology*, **67**, 7088-7095.
- Summerfield, A., Alves, M., Ruggli, N., De Bruin, M. G. M. & McCullough, K. C. (2006) High IFN-alpha responses associated with depletion of lymphocytes and natural IFN-producing cells during classical swine fever. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **26**, 248-255.
- Summerfield, A., Knoetig, S. M., Tschudin, R. & McCullough, K. C. (2000) Pathogenesis of granulocytopenia and bone marrow atrophy during classical swine fever involves apoptosis and necrosis of uninfected cells. *Virology*, **272**, 50-60.
- Summerfield, A. & McCullough, K. C. (2009) The porcine dendritic cell family. *Developmental and Comparative Immunology*, **33**, 299-309.

- Takaoka, A. & Yanai, H. (2006) Interferon signalling network in innate defence. *Cellular Microbiology*, **8**, 907-922.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. & Thiel, H. J. (1997) Serine protease of pestiviruses: Determination of cleavage sites. *Journal of Virology*, **71**, 5415-5422.
- Thiel, H. J., Plagemann, P. G. & Moennig, V. (1996) *Pestiviruses*, Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, New York.
- Thiel, H. J., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T. & Meyers, G. (1991) Hog-Cholera Virus – Molecular Composition of Virions from a Pestivirus. *Journal of Virology*, **65**, 4705-4712.
- Tratschin, J. D., Moser, C., Ruggli, N. & Hofmann, M. A. (1998) Classical swine fever virus leader proteinase N-pro is not required for viral replication in cell culture. *Journal of Virology*, **72**, 7681-7684.
- Tscherne, D. M., Evans, M. J., MacDonald, M. R. & Rice, C. M. (2008) Transdominant inhibition of bovine viral diarrhea virus entry. *Journal of Virology*, **82**, 2427-2436.
- Turan, K., Mibayashi, M., Sugiyama, K., Saito, S., Numajiri, A. & Nagata, K. (2004) Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Research*, **32**, 643-652.
- van Oirschot, J. T. & Terpstra, C. (1977) A congenital persistent swine fever infection. I. Clinical and virological observations. *Veterinary Microbiology*, **2**, 121-132.
- van Oirschot, J. T. & Terpstra, C. (1989) *Hog Cholera virus*, Elsevier, Amsterdam.
- Vantsis, V. T., Linklater, K. A., Rennie, J. C. & Barlow, R. M. (1979) Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of border disease. *J Comp Path*, **89**, 331-339.
- Vilcek, J. (2003) Novel interferons. *Nature Immunology*, **4**, 8-9.
- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M. & Maniatis, T. (1998) Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Molecular Cell*, **1**, 507-518.
- Weber, F., Haller, O. & Kochs, G. (2000) MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *Journal of Virology*, **74**, 560-563.
- Wengler, G. (2009) The regulation of disassembly of alphavirus cores. *Archives of Virology*, **154**, 381-390.
- Wiskerchen, M. & Collett, M. S. (1991) Pestivirus Gene-Expression - Protein P80 of Bovine Viral Diarrhea Virus is a Üroteinase involved in Polyprotein Processing. *Virology*, **184**, 341-350.

- Wong, A. H. T., Tam, N. W. N., Yang, Y. L., Cuddihy, A. R., Li, S. Y., Kirchhoff, S., Hauser, H., Decker, T. & Koromilas, A. E. (1997) Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *Embo Journal*, **16**, 1291-1304.
- Wreschner, D. H., McCauley, J. W., Skehel, J. J. & Kerr, I. M. (1981) Interferon Action-Sequence Specificity of the PPP(A2'P)NA-dependent Ribonuclease. *Nature*, **289**, 414-417.
- Xu, J. A., Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S. & Rice, C. M. (1997) Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: Polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *Journal of Virology*, **71**, 5312-5322.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, **5**, 730-737.
- Yu, X. K., Qiao, M., Atanasov, I., Hu, Z. Y., Kato, T., Liang, T. J. & Zhou, Z. H. (2007) Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology*, **367**, 126-134.
- Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G. & Kuhn, R. J. (2003) Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural Biology*, **10**, 907-912.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Riedel, C., Lamp, B., Heimann, M., Rümenapf, T. (2010). Characterization of essential domains and plasticity of the CSFV Core-Protein. J. Virol. 2010 Aug 11. [Epub ahead of print].



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5712-1



9 783835 957121